THESIS MUNICH 1965

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

Untersuchung über den Reaktionsmechanismus der oxydativen Phosphorylierung am überlebenden Froschherzen

Zur Wirkungsspezifität der K-Vitamine

FRANK LASBECK

Dissertationsdruck Franz Frank, München 23,
Werneckstraße 27, Tel. 34 36 51

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Th. Bücher

Untersuchung über den Reaktionsmechanismus der oxydativen Phosphorylierung am überlebenden Froschherzen

Zur Wirkungsspezifität der K-Vitamine

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Frank Asbeck
aus Hamburg-Harburg

1965

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Priv.Doz. Dr. E. Meyer
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. A. Butenandt
Dekan:	Prof. Dr. R. Zenker
Tag der mündlichen Prüfung:	9.11.1965

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Priv.Doz. Dr. Erich Meyer in der Zeit von Januar 1960 bis Oktober 1961 am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität München ausgeführt.

Für die Anregung zu dieser Arbeit sowie für das große Interesse an ihrem Fortgang und die vielen wertvollen Ratschläge und Diskussionen möchte ich an dieser Stelle Herrn Priv.Doz. Dr. Erich Meyer sehr herzlich danken.

Herrn Professor Dr. Adolf Butenandt, ehem. Direktor des Physiologisch-Chemischen Institutes der Universität München, bin ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes, die Übernahme des Correferates und die freundliche Aufnahme auch in die Gemeinschaft des Max Planck-Institutes für Biochemie zu aufrichtigem Dank verpflichtet.

Ebenso bin ich Herrn Professor Dr. Peter Karlson für sein Interesse an meiner Arbeit und für die Überlassung von Abbildungen dankbar verbunden.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Chemie und Wirkung der Biogenen Chinone	2
Tocopherol	2
Ubichinon	4
Plastochinon	5
Phyllochinon	6
Wirkungsmechanismus biogener Chinone als Katalysator der oxydativen Phosphorylierung	10
Redoxkatalysatoren	10
Zwischenträger für energiereiches Phosphat	12
Lokalisation der Chinone in der Atmungskette	14
Methodik	20
Versuchsergebnisse	29
Phyllochinon und der isometrische Kontraktionsablauf des Herzens	29
Die Verarmung des hypodynamen Herzens	30
Verarmung an Substraten	31
Verarmung an enzymatischen Cofaktoren	33
Analogie der Vorgänge der Zellatmung mit jenen der Herzkontraktion	36
Verarmung an Chinonen	38
Energiestoffwechsel	43
Energiereiche Phosphate beim Wechsel der aeroben zur anaeroben Phase	44
Energiereiche Phosphate im hypodynamen Zustand des Froschherzens	49
Energiereiche Phosphate nach Reaktivierung des Herzens mit Phyllochinon (Vitamin K)	52
Die Reaktivierung der oxydativen Phosphorylierung durch Phyllochinon im hypodynamen Froschherzen	53
Morphologische Befunde	56
Diskussion	61
Zusammenfassung	65
Literaturverzeichnis	66

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40154016_0005

EINLEITUNG

Die vergangenen Jahrzehnte biochemischer Forschung haben auf den verschiedenen Gebieten des Zellstoffwechsels so grundlegend neue Erkenntnisse gebracht, daß die Biochemie immer mehr zu einer der wichtigsten Grundlagen der allgemeinen Biologie und der Medizin geworden ist. In der einzelnen Zelle können immer mehr Funktionen bestimmten histologischen oder submikroskopischen Strukturen zugeordnet werden, so daß sich in enger Zusammenarbeit mit der elektronenoptischen Forschung eine "Topochemie" der Zelle entwickelte, durch die heute schon der Ort sehr vieler Stoffwechselleistungen innerhalb des Zellorganismus' genauer bekanntgeworden ist. Je mehr die morphologischen Zusammenhänge bekannt werden, desto mehr wird die Abhängigkeit vieler biochemischer Funktionsabläufe von der intakten Zellstruktur verständlich.

Zu den Objekten intensiver Forschung während der letzten Jahre gehören das Mitochondrion und die in ihm ablaufenden, im Mittelpunkt des zellulären Energiestoffwechsels stehenden Vorgänge der Atmungskettenphosphorylierung, durch die der atmende Organismus in die Lage versetzt wird, mit Hilfe des aufgenommenen Luftsauerstoffes Nahrungsbestandteile zu verbrennen, um so seinen Bedarf an chemischer Energie und Wärme zu decken. Von den neuentdeckten Faktoren, denen im Verlauf dieser Fermentketten eine immer größere Bedeutung beigemessen wird, stehen vor allem verschiedene Chinonkörper (Ubichinon, Phyllochinon, Tocopherol, Plastochinon, um nur die wichtigsten Gruppen zu nennen) im Mittelpunkt des Interesses.

Aufgabe dieser Arbeit ist es, in einem ersten Kapitel die chemische Natur und biologische Bedeutung dieser Chinone näher zu beschreiben, im zweiten und dritten Teil auf die theoretischen Grundlagen und die bisherigen Vorstellungen über die Art ihrer Wirkung innerhalb der Atmungskettenphosphorylierung einzugehen und zum Schluß an einem neuartigen Versuchsobjekt einen experimentellen Beitrag zu diesem Thema zu liefern.

CHEMIE UND WIRKUNG BIOGENER CHINONE

Seit längerer Zeit ist der "Vitamin-Charakter" verschiedener pflanzlicher Chinone, d.h. deren Bedeutung als essentieller Nahrungsfaktor für den tierischen Organismus bekannt. Diese Stoffe stellen Derivate der Benzo- oder Naphthochinone dar, die für die tierische Zelle von Bedeutung sind und auf deren Zufuhr mit der Nahrung sie offenbar angewiesen ist. Die in 1,4-Stellung substituierten Benzol- oder Naphtholringe können jedenfalls von ihr weder vollständig synthetisiert noch aus den vorhandenen aromatischen Metaboliten des Aminosäurestoffwechsels (Derivaten des Tyrosins oder des Tryptophans) gebildet werden. Eine Ausnahme scheint hier das Ubichinon zu machen, dessen zelluläre Synthese in der letzten Zeit vermutet wird (1,2,3).

Tocopherol

Das Tocopherol wurde als essentieller Nahrungsfaktor 1922 von Evans zuerst beschrieben. Ein reines Ausgangsmaterial zur chemischen Strukturaufklärung konnte jedoch erst im Jahre 1936 isoliert werden. Über die biologische Funktion dieses Stoffes war nicht viel bekannt. Evans hatte durch Vitamin E-freie Aufzucht Fertilitätsstörungen bei Rattenweibchen hervorrufen können, jedoch war eine allgemeinere Bedeutung zu vermuten, da bei Vitamin E-frei ernährten Kaninchen Muskeldystrophien zu beobachten waren.

Die Kenntnisse über die biologische Funktion der Tocopherole haben seit den 50er Jahren wesentlich an Umfang zugenommen. Seit Slater (4,5) im Keilin-Hartree-Herzmuskelpräparat einen Vitamin E-Gehalt von 1,1 Mol/g Protein nachweisen konnte und nachdem durch Søndergaard u. Dam (6) bekannt geworden ist, daß sich der Hauptanteil des zellulären Vitamins E in den Mitochondrien befindet, wird dem Tocopherol eine allgemeine Rolle im Rahmen der energieliefernden Stoffwechselprozesse zugeschrieben. Es konnte nachgewiesen werden (7,8,9), daß Mitochondrien Vitamin E-frei ernährter Tiere einen erhöhten Sauerstoffverbrauch und eine verminderte Fähigkeit zu oxydativer Phosphorylierung aufweisen

und daß diese beiden mitochondrialen Funktionen durch eine Zufuhr von Tocopherol wieder normalisiert werden können. Dies führte Slater (10) zu der Auffassung, daß Tocopherol in eine Phosphorylierungsstufe der Atmungskette einbezogen ist, wodurch sich der erhöhte O_2-Verbrauch, die vermehrte Wärmeproduktion und der damit verbundene niedrige P/O-Quotient des durch Vitamin E-Mangel dystrophischen Muskels erklären würde.

Diese Überlegungen berücksichtigen eine mögliche Funktion des Tocopherols als Redoxsystem innerhalb der energieübertragenden Reaktionsketten des Mitochondriums. In Abb. 1 ist die Umwandlung des Tocopherols in das Tocochinon als ein Beispiel der möglichen Reaktionsweisen des Vitamins E innerhalb einer Kette von Redoxsystemen angeführt. Die Aufspaltung des Chromanringes unter gleichzeitiger Oxydation des chinoiden Systems wäre in diesem Fall die energieübertragende Vermittlerfunktion,

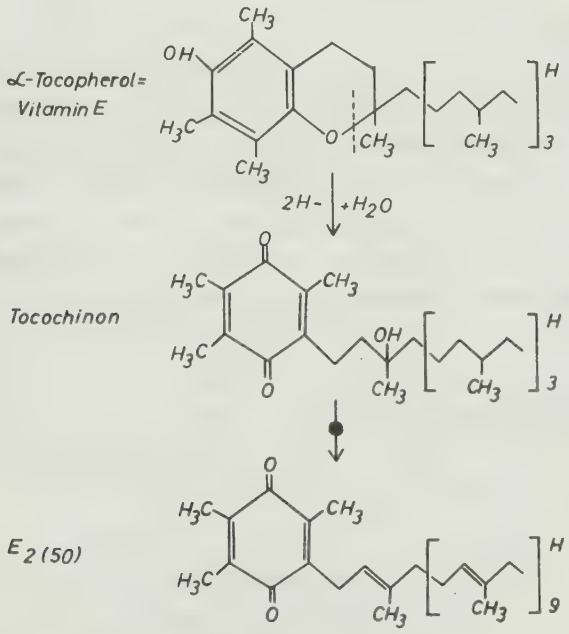


Abb. 1

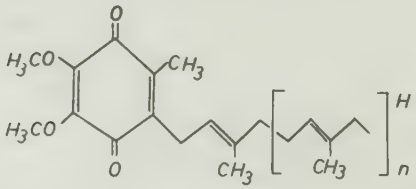
Umwandlung von α-Tocopherol im tierischen Gewebe

die das Tocopherol zwischen zwei benachbarten Reaktionspartnern innehaben würde. Von der einen Seite würde es dann reduziert werden, von der anderen wieder oxydiert, um auf diese Weise ein funktionelles Glied in einer Elektronen-übertragenden Kette zu bilden.

Es war nun nicht zu erwarten, daß α-Tocopherol im tierischen Stoffwechsel nicht verändert und hier in derselben Form als Cofaktor vorliegen würde, in der es aus der Nahrung in den Organismus gelangt und in der es z.B. aus pflanzlichem Material isoliert werden kann. Hierzu konnte Martius (11) in einer kürzlich erschienenen Arbeit wahrscheinlich machen, daß α-Tocopherol in der Zelle in das 2,5,6-Trimethyl-3-(farnesyl-farnesyl-geranyl-geranyl)-1,4-benzochinon umgewandelt wird, das Martius als "Vitamin $E_{2\,(50\,C)}$" (siehe Abb. 1) bezeichnet. Bermerkenswert ist, daß es in dieser Form eine große Ähnlichkeit mit dem Ubichinon gewonnen hat.

Ubichinon

Ubichinon ist erst in den letzten Jahren entdeckt worden. Seit 1956 arbeiten in erster Linie die Arbeitsgruppen um Morton (12,13) und Wiss (13) an der Konstitutionsermittlung dieses Stoffes. Es handelt sich ebenfalls um ein vollsubstituiertes Benzochinon, das jedoch gegenüber $E_{2(50)}$ eine 2,3-Methoxy-Gruppierung trägt (Abb. 2). Der Vitamincharakter dieser Substanz ist noch umstritten, da über die Herkunft des Benzochinonringes noch keine Klarheit besteht. Die Annahme von Olsen u.a. (1),



Ubichinon

n:9 = Ubichinon 50 (Hefe)
n:5 = Ubichinon 30 (Schweineherz)

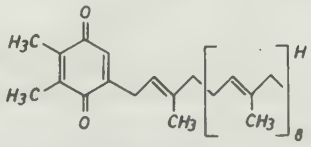
Abb. 2

das Ringsystem würde in der Zelle selbst aus Phenylalanin gebildet, ist bisher nicht bestätigt. Als gesichert darf auf der anderen Seite die zelluläre Synthesemöglichkeit der Seitenkette aus Mevalonsäure (2) gelten.

Das biochemische Interesse konzentrierte sich stark auf diesen Stoff, da das Ubichinon sowohl in pflanzlichen als auch in tierischen Geweben weit verbreitet ist. Außerdem hat es den Anschein, daß Ubichinon in atmungsaktiven Geweben in besonders hoher Konzentration anzutreffen ist. So bildet z. B. die Bierhefe bei aerobem Wachstum sehr viel Ubichinon$_{(30)}$, während sie bei anaerober Stoffwechsellage keines synthetisiert (14). Bei allen Analysen hat sich gezeigt, daß Ubichinon zum überwiegenden Teil in den Mitochondrien zu finden ist, und zwar in Konzentrationen, die etwa das Zwölffache derjenigen anderer bekannter Atmungscofermente betragen. Davon sind etwa 75 % verhältnismäßig leicht durch organische Lösungsmittel zu extrahieren, während der Rest erst nach Verseifung mit Alkali freigesetzt werden kann (50). Die nahe chemische Verwandtschaft mit $E_{2(50)}$ läßt dabei an eine ähnliche Funktion dieser beiden Stoffe als Chinon-Hydrochinon-Redoxsystem der Atmungskette oder als energieübertragender Vermittler innerhalb der oxydativen Phosphorylierung denken (siehe Seite 10).

Plastochinon

Eine weitere Substanz dieser Stoffklasse ist das Plastochinon ("Koflers-Chinon"), das zusammen mit dem Ubichinon in höheren Pflanzen zu finden ist (15). Beide Stoffe sind sehr ähnlich gebaut (Abb. 3) und zeigen ein ähnliches chemisches Verhalten. Mit Borhydrid lassen sich beide Substanzen sehr schnell reduzieren.



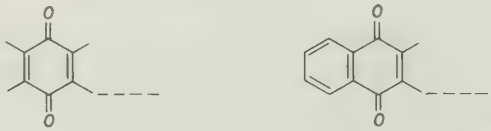
Plastochinon

Abb. 3

Bemerkenswert ist, daß dieses Chinon ausschließlich in den grünen Teilen der Pflanzen vorkommt, während Ubichinon auch in den Mitochondrien der chlorophyllfreien Stengel und Wurzeln anzutreffen ist. Es liegt daher die Annahme nahe, daß Plastochinon für die Funktion der energieübertragenden Redoxsysteme der Chloroplasten von Bedeutung ist und hier eine wesentliche Rolle im Rahmen der Photosynthese spielt, da dieses Chinon zudem in keinem anderen Teil der Pflanze nachgewiesen werden konnte.

Phyllochinon

Die bisher besprochenen Chinonkörper waren solche mit einem Benzochinonringsystem - oder doch, wie beim Tocopherol, mit einem Chromanring, der wahrscheinlich in der Zelle zu einem Benzochinon umgewandelt wird. Das Phyllochinon hat dagegen einen Naphthochinonring, in dem man jedoch ebenfalls einen vollsubstituierten Benzochinonring erblicken kann:



Substituiertes Benzochinon *Substituiertes Naphthochinon*

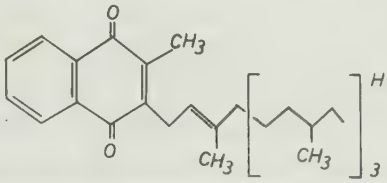
Abb. 4

Ringsysteme der biogenen Chinone

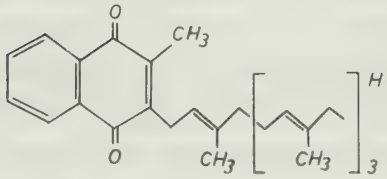
Vitamin K wurde im Jahre 1935 von D a m nach fast zehnjähriger Arbei als essentieller Nahrungsfaktor für die Aufzucht von Hühnern erkannt. Es bekam den Namen "antihaemorrhagisches Vitamin", weil sich nach lipoidfreier Aufzucht von Kücken herausstellte, daß die Tiere an Haut- und Schleimhautblutungen zugrunde gingen. Die Strukturaufklärung gelang erst 1939 Karrer, Fieser und Doisy.

Vitamin K ist in der Natur sehr weit verbreitet. Besonders reichlich wird es in den Chloroplasten der grünen Pflanzen angetroffen - eine Tatsache, die zu dem Namen "Phyllochinon" führte. Aber auch Mikroorganismen enthalten oder synthetisieren große Mengen von Vitamin K oder

Derivaten, so daß der Bedarf der Säugetiere völlig durch die Darmflora (vor allem das Bakt. Coli) gedeckt wird. Anders liegen die Verhältnisse beim Vogel: Hier sind die Kürze des Darmrohrs und die schnelle Darmpassage wohl dafür verantwortlich, daß die Vitamin K-Synthese der Darmbakterien nicht ausreicht und deshalb eine Zufuhr mit der Nahrung erforderlich wird.



Vitamin K_1 - 20 - C



K_2 - 20 - C

Biologisch wirksame Verbindungen aus der Vitamin K - Reihe

Abb. 5

In den Zellfraktionen verschiedener Organe konnte Martius (16) folgenden Gehalt an Vitamin K feststellen:

Herz:	M-Fraktion	0,86	µ Mol/g N
	K-Fraktion	0,15	"
Leber:	M-Fraktion	0,11	"
	K-Fraktion	0,05	"
Niere:	M-Fraktion	0,07	"
	K-Fraktion	0,01	"

M-Fraktion = Mitochondrienfraktion
K-Fraktion = Kernfraktion

An diesen Befunden zeigt sich sehr eindrucksvoll der sehr hohe Vitamin-K-Gehalt der Mitochondrien, die im übrigen in der Herzmuskelzelle

gegenüber allen anderen Geweben die weitaus höchste Konzentration an Phyllochinon erreichen.

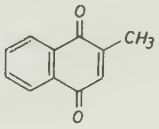
Da die K-Avitaminose des Menschen in erster Linie zu einer haemorrhagischen Diathese mit Verminderung des Prothrombins und der Gerinnungsfaktoren VII, IX und X im Serum führt, wurde lange Zeit angenommen, daß die physiologische Bedeutung des Vitamins K in der Vermittlung der Synthese von Gerinnungsfaktoren in der Leber zu suchen sei. Diese Ansicht ist jedoch heute nicht mehr haltbar, und es muß dem Vitamin K eine viel allgemeinere Bedeutung bei Vorgängen der oxydativen Phosphorylierung im Organismus zuerkannt werden. So weist Martius (17) schon seit langer Zeit auf den hohen Vitamin K-Gehalt der Herzsarkosomen hin - eine Tatsache, die mit der Synthese von Blutgerinnungsfaktoren nicht gut erklärt werden kann -, und deutet die haemorrhagische Diathese bei K-Avitaminose als Folge einer verminderten ATP-Synthese in der Leber, wodurch eine ausreichende Bildung dieser Serumeiweißkörper mit kurzer Halbwertszeit nicht mehr gewährleistet ist.

Durch die Arbeiten über die Bedeutung des Phyllochinons im Rahmen der oxydativen Phosphorylierung wurden noch mehrere andere Stoffe mit Vitamin K-Wirksamkeit bekannt. In der Vitamin K_2-Reihe sind die Naphthochinonringe nicht mit der Phytylseitenkette sondern mit einer verschieden großen Anzahl von hintereinanderhängenden Isoprenresten verknüpft (Abb. 5).

Martius (18, 19) konnte nun 1960 zeigen, daß die Hühnerleber Phyllochinon in die Phytylseitenkette und Methylnaphthochinon aufspaltet, welches anschließend über Geranyl-geraniol-pyrophosphat mit einer neuen Seitenkette von 20 C-Atomen verknüpft wird. Das auf diesem Wege gebildete Vitamin $K_{2(20\ C)}$ stellt offenbar die in der Zelle wirksame Form des Vitamins K dar (Abb. 5).

Neuerdings weist Martius (20) darauf hin, daß Vitamin K_2 mit hoher Wahrscheinlichkeit auch in einer Form mit noch längerer Seitenkette (50 C) in der Zelle vorliegt, eine Tatsache, die eine funktionelle Verwandtschaft dieser drei Verbindungen: Ubichinon 50, Vitamin $E_{2(50)}$ und Vitamin $K_{2(50)}$ noch unterstreichen würde.

Auf diese Weise erklärt sich auch die Wirksamkeit eines weiteren Stoffes der schon aus den Anfängen der Vitamin K-Forschung bekannt ist: des Menadions (Vitamin K_3), das den methylsubstituierten Naphthochinonring ohne jede Seitenkette darstellt (Abb. 6).

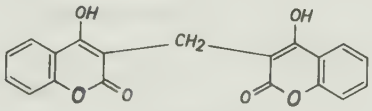


Menadion
(Vitamin K_3)

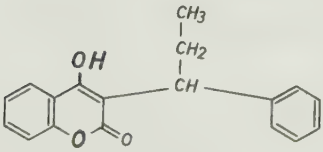
Abb. 6

Es wird durch die genannte Arbeit von Martius verständlich, daß sich Menadion im Hühnchenexperiment ebenfalls als Vitamin K-wirksam erweist. Anders verhält es sich im in-vitro-Versuch, wo die Wirkung dieses Stoffes nicht mit derjenigen anderer K-Vitamine parallelläuft (s. später).

Als ausgeprägte Antagonisten der K-Vitamine sind Stoffe gefunden worden, die eine gewisse chemische Verwandtschaft zum Naphthochinonringsystem aufweisen und im Stoffwechsel offenbar eine kompetitive Verdrängung des Vitamins hervorrufen. Zu diesen Stoffen gehören die Cumarine, von denen das Dicumarol und das Marcumar als Anticoagulantien Eingang in die Medizin gefunden haben.



Dicumarol



Marcumar

Abb. 7

Entkoppler der oxydativen Phosphorylierung, die als Anticoagulantien Verwendung finden.

Gleichzeitig konnte nachgewiesen werden, daß dieser vermutliche kompetitive Hemmechanismus auch in vitro die Phosphorylierung isolierter Mitochondrien unterbindet, während deren Atmung erhalten bleibt. Es wird also durch diese Substanzen eine Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung hervorgerufen, was die Bedeutung des Vitamins K in diesem Zusammenhang nur noch unterstreicht.

WIRKUNGSMECHANISMUS BIOGENER CHINONE ALS KATALYSATOREN DER OXYDATIVEN PHOSPHORYLIERUNG

Im vorangehenden Abschnitt wurden die einzelnen Gruppen von Chinonkörpern aufgeführt, die vermutlich in der Zelle im Zusammenhang mit der oxydativen Phosphorylierung stehen. Es stellt sich nun die Frage, ob diesen grundsätzlich nach demselben Prinzip gebauten Substanzen auch eine gleiche oder ähnliche biologische Funktion zugeschrieben werden kann und worin eine solche Funktion bestehen könnte.

1. Redoxkatalysatoren

In der einfachsten Form können die Chinone wohl als Überträger des Wasserstoffs in den verschiedenen Wegen der Atmungskette wirken. Sie nehmen sehr leicht Elektronen auf, werden damit zum Hydrochinon reduziert und können durch geeignete Wasserstoffakzeptoren wieder oxydiert werden. In dieser Weise reagieren die hier besprochenen Benzochinone: Ubichinon, Plastochinon und $E_{2(50)}$. Für α-Tocopherol sind außerdem noch weitere Reaktionsmöglichkeiten denkbar, wie z. B. die in Abb. 1 angegebene Umwandlung in Tocochinon. Die Naphthochinonringe der verschiedenen K-Vitamine reagieren in analoger Weise unter Bildung der entsprechenden Naphthohydrochinone.

Hiermit wären die wichtigsten, zur Diskussion stehenden Redoxreaktionen der Chinone kurz umrissen. Chemische Reaktionen laufen jedoch in der Zelle nur in seltenen Fällen unkontrolliert und von selbst ab, sondern sie werden in der Regel durch spezifische Enzyme vermittelt. Derartige, mit

Chinonen reagierende Fermente konnten auch in einigen Fällen isoliert werden. An erster Stelle ist hier die von Martius (34) entdeckte Phyllochinonreduktase zu nennen, die Wasserstoffionen von DPN [x]) oder TPN auf Phyllochinon zu übertragen vermag. Es handelt sich bei diesem Ferment um ein bis dahin unbekanntes Flavoproteid mit FAD als Wirkungsgruppe, welches mit der sehr hohen Wechselzahl von 1×10^6 arbeitet. Durch Dicumarol kann dieses Enzym gehemmt werden, nicht jedoch durch Dinitrophenol. Schwierig ist nur eine gewisse Substratunspezifität der Phyllochinonreduktase zu deuten, welche mit einer größeren Zahl von Chinonen (unter anderen auch mit Menadion!) reagiert - und dies teilweise in noch stärkerem Maße als mit dem Phyllochinon (30, 35).

Von Wosilait u. Nason (36) wurden Fermentaktivitäten von Mitochondrien beschrieben, durch die Ubichinone verschiedener Kettenlänge reduziert werden können.

Außerdem gelang es Ziegler (51) und Hatefi und Mitarbeitern (52) Flavoproteide darzustellen, die Succinat und DPNH rasch oxydieren und den Wasserstoff auf Ubichinone zu übertragen vermögen, wie dies aus dem Schema in Abb. 9 hervorgeht. Beide Fermente enthalten Eisenatome, die offenbar für die Enzymaktivität von großer Bedeutung sind.

Mit der Isolierung dieser Fermente hatte man nun erstmals sichere Anhaltspunkte für die Stellung der Chinone in der Atmungskette gewonnen. Daß diese Lokalisation jedoch auch theoretisch gefordert werden mußte, zeigt ein Vergleich der Redoxpotentiale, aus denen die physikalischen Voraussetzungen für die Reaktionen der einzelnen Glieder der Atmungskette hervorgehen (teilweise nach Karlson):

- 0,32 V	DPNH + $H^{(+)}$ / $DPN^{(+)}$
- 0,185 V	Riboflavin-P . H_2 / Riboflavin-P
- 0,06 V	Flavoproteine
- 0,05 V	Phyllohydrochinon/Phyllochinon
- 0,04 V	Cytochrom b

---

x) Im Verlauf der Darstellung werden folgende Abkürzungen verwendet: ADP = Adenosindiphosphat, ATP = Adenosintriphosphat, Cyt. a, b, c usw. = Cytochrome a, b, c usw., DPN = Diphosphopyridinnukleotid, FAD = Flavinadenin-dinukleotid, Fp_D = DPNH-Dehydrogenase, Fp_S = Succinatdehydrogenase, KP = Kreatinphosphat, TPN = Triphosphopyridinnukleotid.

etwa	+ 0,17 V	Tocochinon
	+ 0,26 V	Cytochrom c
	+ 0,29 V	Cytochrom a
	+ 0,81 V	$1/2\ O_2\ /O^{2-}$

2. Zwischenträger für energiereiches Phosphat

Viele Versuchsergebnisse sprechen dafür, daß die Chinone an bestimmten Stellen der energieübertragenden Reaktionsketten in den Mitochondrien angreifen. Sowohl durch Chinon -(K_1)-freie Aufzucht von Hühnern wie auch durch Präparationsmethoden mit organischen Lösungsmitteln kann man an Chinonen verarmte, atmende Mitochondrien oder Mitochondrienbruchstücke erhalten, die keine Phosphorylierung mehr zeigen (21-23, 28, 29). Dieser Effekt ist so zu erklären, daß in den Chinon-verarmten Mitochondrien entweder nur noch Nebenwege der Atmungskette beschritten werden können, die auch normalerweise nicht mit einer Phosphorylierung einhergehen, oder daß in der Atmungskette der Elektronentransport weiterhin auf dem üblichen Wege abläuft, ohne daß es jetzt infolge des Fehlens einer Vermittlersubstanz noch möglich ist, die freiwerdende Energie zur ATP-Synthese zu verwenden.

Als Beweis für die Richtigkeit der ersten Vorstellung wird die Tatsache angeführt, daß eine solche Entkopplung des Elektronentransports von der Phosphorylierung außer mit Dinitrophenol auch mit Cumarinderivaten, den Vitamin-K-Antagonisten, zu erreichen ist (24).

Rein theoretisch hat Lehninger (25,26) diesen Ablauf der Phosphorylierung folgendermaßen formuliert (aus Karlson, Lehrbuch der Biochemie) (s. nächste Seite, Abb. 8):

In diesem Schema nimmt Lehninger einen Zwischenträger Z an, dessen Bindung zu dem Phosphatakzeptor X durch Oxydation auf ein höheres Energieniveau gebracht wird. Über die Natur dieser hypothetischen Zwischenträger Z und X ist nicht viel bekannt. Da jedoch beim Durchgang eines Elektronenpaares durch die Atmungskette drei Moleküle ATP auf drei verschieden hohen Stufen des Energiegefälles synthetisiert werden, müßte in

diesem Fall für jede der drei Reaktionen ein besonderer Zwischenträger angenommen werden, weil auf den drei Phosphorylierungsstufen unterschiedliche energetische Reaktionsbedingungen vorherrschen.

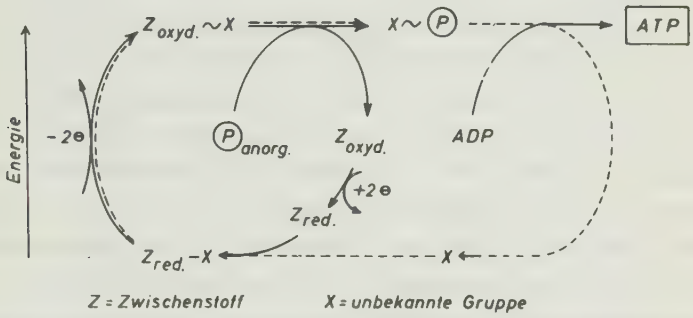


Abb. 8

Die mutmaßliche Bedeutung von Zwischenträgern für Phosphat im Rahmen der oxydativen Phosphorylierung. Nach LEHNINGER (25, 26) aus KARLSON, Lehrbuch der Biochemie.

Martius (27-31) nimmt nun an, daß an einer dieser Positionen einer der Wirkungsorte des Vitamins K zu suchen ist - eine Theorie, die sich mit den bekannten experimentellen Befunden durchaus vereinbaren ließe. Nach Martius würde dann das Vitamin K in seiner Hydrochinonform sich mit einem anorganischen Phosphatrest verbinden. Diese energiearme Phosphatbindung wird nun durch Oxydation des Hydrochinons an der Atmungskette in eine energiereiche Phosphatbindung überführt, die auf das ATP übertragen werden kann.

Ähnliche Vorstellungen formulieren noch einige andere Autoren. Slater (10) sieht die Aufgabe des Tocopherols darin, als Überträger der energiereichen Phosphatbindung auf das ADP zu fungieren. Auf der anderen Seite hält Green (32, 33) es für wahrscheinlich, daß Ubichinon - wenigstens auf einer Phosphorylierungsstufe - an diesem Vorgang teilnimmt. Boyer (53) hält 3-Phosphoryl-Histidin für einen Vermittler der oxydativen Phosphorylierung.

LOKALISATION DER CHINONE IN DER ATMUNGSKETTE

Der wichtigste Vorgang des Zellstoffwechsels - ja innerhalb der lebendigen Materie überhaupt - ist die Bereitstellung von chemischer Energie für die vielfältigen metabolischen Leistungen, die eine Zelle während ihres Lebens zu erfüllen hat. Diese Energie wird im tierischen Organismus durch die Umwandlung ("Verbrennung") energiereicher Stoffe in energieärmere gewonnen und zwar je nach der biologischen Differenzierung des Lebewesens oder der einzelnen Zelle mit einem unterschiedlichen Wirkungsgrad. Um die bei diesen Umwandlungsprozessen freiwerdende Energie nicht mit einem Schlage verpuffen zu lassen, vollziehen sich diese Oxydationsprozesse in sehr genau gelenkten Bahnen an einer Kette von sinnvoll hintereinander geschalteten Fermenten und Redoxkatalysatoren, die diese Reaktion in kleinere Einzelschritte aufteilen und auf drei Stufen verschieden hohen Energieniveaus das ATP, den chemischen Energiespeicher der Zelle, synthetisieren. Diese, die Reaktion der oxydablen Substanzen mit dem Luftsauerstoff katalysierende "Atmungskette" ist nach neueren Forschungen im Mitochondrium fest an eine für ihre Funktion offenbar wichtige Struktur abwechselnder Protein- und Lipoidschichten gebunden, aus der sie durch biochemische Methoden, nicht ohne dabei eine Veränderung zu erfahren, herausgelöst werden kann. Zwar läßt sich die ganze Kette durch geeignete Manipulationen in mehrere Bruchstücke zerlegen, die in den meisten Fällen auch noch die Oxydation und die Reduktion bestimmter Substrate katalysieren, doch wird die mit diesen Reaktionen normalerweise gekoppelte Fähigkeit zur ATP-Synthese fast immer dabei eingebüßt.

Obwohl die Ansichten über die Bedeutung bestimmter Teilkomponenten der Atmungskette auch heute noch sehr unterschiedlich sind, darf eine Anzahl von Reaktionspartnern und -schritten als gesichert gelten. Fest steht z.B., daß der Wasserstoff der oxydierten Substrate vermittels DPNH auf ein erstes Flavoprotein der Kette übertragen wird, und daß von den Substraten nur das Succinat und Glycerophosphat direkt mit anderen Flavoproteinen reagieren können. Der weitere Transport der

Elektronen (denn um einen solchen Vorgang handelt es sich ja bei diesen hintereinander geschalteten Redoxprozessen !) erfolgt nun über einige Zwischenträger, die z. T. heute noch nicht ganz gesichert sind, zu den Cytochromfermenten C_1, C und a, um schließlich mit der Reduktion des elementaren Sauerstoffs zu enden, welcher mit dem letzten der Cytochrome direkt zu reagieren vermag. Green (33) formuliert die Atmungskette heute folgendermaßen:

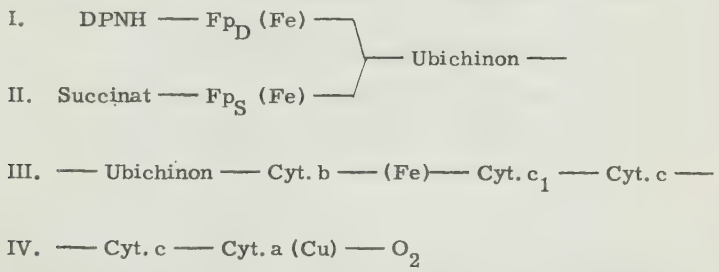


Abb. 9 Stellung des Ubichinons in der Atmungskette nach GREEN (33).

In diesem Schema stellen Fp_D und Fp_S die beiden Flavoproteine dar, über die der Wasserstoff vom DPNH und vom Succinat her in die Kette eintritt. Beide Flavoproteine übertragen den Wasserstoff nun auf ein Chinon - in diesem Fall der Ansicht Greens gemäß auf das Ubichinon - als DPNH-Ubichinon-Reduktase und als Succinat-Ubichinon-Reduktase. Die Fermente dieser beiden ersten Reaktionsschritte der Atmungskette finden sich in den ersten beiden, durch biochemische Aufarbeitung erhältlichen Elementarpartikeln der Mitochondrien, denen auch jeweils eine Phosphorylierungsstufe zugeordnet ist. Abschnitt III. umfaßt die weitere Reaktionsfolge von Redoxprozessen beim Durchlaufen eines Elektronenpaares durch die Kette. Mit diesem Abschnitt ist der zweite Phosphorylierungsschritt gekoppelt. Die Cytochromoxydase endlich überträgt die Elektronen des Cytochroms c auf den Sauerstoff und stellt damit das letzte, mit der dritten Phosphorylierungsstufe gekoppelte, elektronentransportierende Elementarteilchen dar.

Außer den genannten Einzelheiten sind in dem Schema noch in der letzten Zeit entdeckte (48) Fe- und Cu-Atome aufgeführt, die nicht in der Form von Haemmolekülen vorliegen sondern z. T. an die Flavoproteine angela-

gert sind. Die Bedeutung dieser Schwermetallionen für den Ablauf der Redoxreaktionen ist bisher nicht bekannt.

Die Kenntnisse dieser Einzelteile der Atmungskette sind - wie beschrieben - durch die biochemische Analyse ihrer Bruchstücke gewonnen worden. Diese Bruchstücke - von Green "Elektronentransportierende Partikel " genannt - stellen die oben näher beschriebenen Komplexe mit definierten biochemischen Katalysatoreigenschaften dar, die jeweils mit einem Phosphorylierungsschritt gekoppelt sind:

I. DPNH - Ubichinon - Reduktase
II. Succinat - Ubichinon - Reduktase
III. Ubichinon H_2 - Cyt. c - Reduktase
IV. Cytochromoxydase

Es ist seit längerer Zeit bekannt, daß zwei Elektronen, die vom DPNH auf das zugehörige Flavoprotein abgegeben werden, beim Durchlaufen dieser Kette die Synthese von 3 Molekülen ATP aus 3 ADP und 3 Molekülen anorg. Phosphats veranlassen. Und zwar erfolgt die Synthese je eines ATP-Moleküls an jedem einzelnen der drei hintereinander hängenden Elementarpartikel vermutlich über ein vermittelndes Kopplungssystem, das die auf den einzelnen Stufen anfallende Energie übernimmt und in eine energiereiche Phosphatbindung überführt. Die Menge des auf diese Weise verbrauchten anorganischen Phosphates kann zur Menge der durch die H^+-Oxydation verbrauchten O_2-Moleküle ins Verhältnis gesetzt werden und ergibt so ein Maß für die Energieausbeute dieser Reaktion, den P/O-Quotienten, der also optimal bei ungestörtem Funktionieren aller drei Kopplungsstufen 3 beträgt.

Martius (30) - ausgehend von seinen Vitamin-K- und Vitamin-E-Studien - entwickelt eine andere Vorstellung von den initialen Reaktionsschritten der Atmungskette. Er hält zwei parallele Wege des Elektronentransportes, von denen der eine mit oxydativer Phosphorylierung verbunden ist, der andere jedoch nicht, für wahrscheinlich und nimmt an, daß in den ersten Phosphorylierungsschritt Vitamin K oder eine analoge Ver-

bindung zusammen mit einem 1957 entdeckten Flavoprotein, der Phyllochinonreduktase, einbezogen ist. Dieser Weg wäre dann bei Abwesenheit von Vitamin K blockiert, so daß der Elektronentransport unter Umgehung der ersten Phosphorylierungsstufe über die Cytochrom-c-Reduktase ablaufen würde (s. Abb. 10). Tatsächlich erhielt Martius in Experimenten mit Lebermitochondrien Vitamin K-frei ernährter Hühnchen P/O-Quotienten, die den Wert 2 nicht übersteigen.

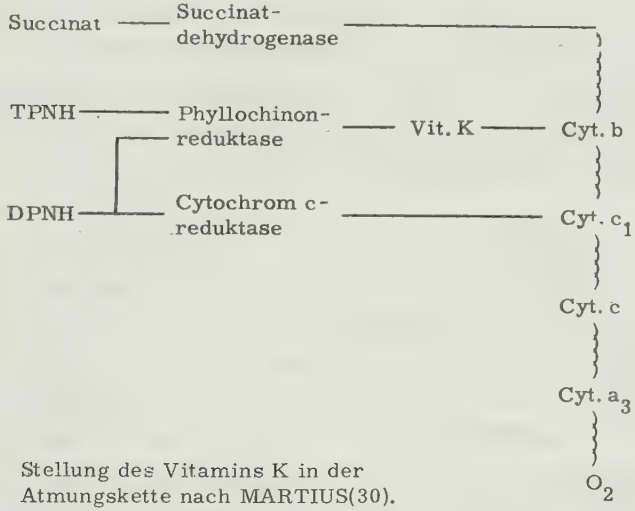


Abb. 10 Stellung des Vitamins K in der Atmungskette nach MARTIUS(30).

Slater (5) versucht die verschiedenen Untersuchungsergebnisse der einzelnen Arbeitsgruppen mit seinen eigenen Befunden in dem unten angegebenen Schema zu vereinigen, wobei jedoch berücksichtigt werden muß, daß diese Ergebnisse mit den unterschiedlichsten Präparationsmethoden und Mitochondrienbruchstücken gewonnen wurden, deren Vergleich wahrscheinlich nicht ohne weiteres möglich ist (Abb. 11, s. nächste Seite).

Ein wesentlicher Unterschied zu den Ansichten der vorgenannten Autoren liegt darin, daß Slater als Wasserstoffakzeptor der Martius'schen Phyllochinonreduktase nicht ein Derivat der K_1- oder K_2-Reihe, sondern das Menadion (K_3) annimmt, eine Möglichkeit, die von Martius ausdrücklich abgelehnt wird. Es geht aus der Gegenüberstellung dieser drei

Schemata des Feinbaus der Atmungskette deutlich hervor, welche Unsicherheiten heute noch bestehen, die verschiedenen Chinonkörper strukturell und funktionell in den Ablauf der schon bekannten Atmungskette einzuordnen, obwohl die verschiedensten Reaktionsmöglichkeiten von Chinonen mit einzelnen Kettengliedern bekannt sind. Dies liegt ohne Zweifel daran, daß eine Desintegration der Mitochondrien zum Studium von Teilschritten der Atmungskette völlig neue Funktionsbedingungen dieser Partikel zur Folge haben muß, wodurch nochmals auf die Notwendigkeit einer Untersuchung der Atmungskette als geschlossenes Ganzes hingewiesen wird. Weiterhin geht aus den Vorstellungen der angeführten Autoren hervor, welche zentrale Stellung den Chinonen heute im Rahmen des oxydativen Zellstoffwechsels zugewiesen wird.

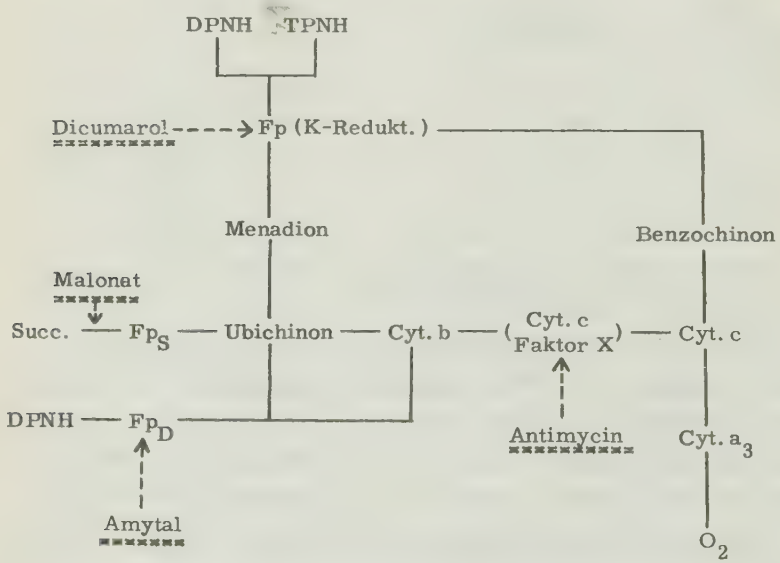


Abb. 11: Aufbau der Atmungskette nach SLATER (5).

Fp = Flavoproteine: Fp_S = Succinatdehydrogenase

Fp_D = Ubichinonreduktase

$Fp_{(K\text{-}Redukt.)}$ = Phyllochinonreduktase

doppelt unterstrichen: Hemmstoffe der Atmungskette und der oxydativen Phosphorylierung

Gewinnung chinon-verarmter Mitochondrien

Wie bei allen Untersuchungen über die Bedeutung von essentiellen Nahrungsfaktoren im Zellstoffwechsel mußten Methoden gefunden werden, um Organismen bzw. Mitochondrien an Chinonen zu verarmen. An solchen Testobjekten können dann Substanzen in Substitutionsversuchen auf ihre Vitaminwirksamkeit hin geprüft werden. Zur Präparation derartiger Mitochondrien sind bisher vor allem 3 Methoden verwendet worden:

Die Chinonmangelernährung (Vit. K)
Die U.V.-Bestrahlung (Vit. K)
Die Isooktanextraktion (Ubichinon, Tocopherol)

Die chinonfreie Aufzucht von Hühnchen hat Martius bei seinen Versuchen mit Vitamin K zu einem Erfolg geführt. Tocopherole werden hingegen in den Fettdepots der verschiedenen Versuchstiere so stark gespeichert, daß eine Verarmung der Mitochondrien an Vitamin E sehr schwer möglich ist. Brodie versucht durch U.V.-Bestrahlung Phyllochinon im Mitochondrium zu inaktivieren (55). Er kann zwar durch Vitamin K-Zusatz eine teilweise Reaktivierung der oxydativen Phosphorylierung erreichen, ohne daß noch weitergehende, sicher anzunehmende Bestrahlungsfolgen an seinem biologischen Objekt auszuschließen sind. Eine teilweise oder vollständige Entfernung von Ubichinon und Tocopherol aus Mitochondrien gelang durch Extraktionen mit organischen Lösungsmitteln wie z.B. Isooktan (10,22,23). Aber schon Green (32,33) weist auf die große Bedeutung der Lipide für den Aufbau der Mitochondrienmembranen hin, die durch derartige Extraktionen also universell geschädigt würden.

Eine neue Methode zur Verarmung von Mitochondrien an Chinonen fand Dohrn (38). Er konnte nachweisen, daß ein mehrere Stunden lang extrakorporal schlagendes und durchströmtes Froschherz einen Aktivitätsverlust zeigt, der durch eine Zufuhr von verschiedenen Chinonen teilweise wieder rückgängig gemacht werden kann. Hierbei wird also nicht mit physikalischen oder chemischen Maßnahmen in das strukturelle Gefüge der Mitochondrien grob eingegriffen. Der Verlust eines solchen Herzens an Coenzymen und anderen Faktoren der oxydativen Phosphorylierung ist

abhängig vom intrazellulären Turnover dieser Stoffe und also um so größer, je mehr deren Abbau im durchströmten Herzen gegenüber der Neusynthese überwiegt.

METHODIK

1. Biologisches Material

Für die Versuche wurden Froschherzen von Rana temporaria und Rana eskulenta verwendet. Es stellte sich bald heraus, daß der Herzstoffwechsel der beiden Froscharten offenbar abhängig von der Jahreszeit großen Schwankungen unterworfen (S.45) ist. Daher war es nötig, für jede Aufarbeitung eine möglichst einheitliche Serie männlicher oder weiblicher Tiere auszuwählen, die dann jeweils zur Hälfte dem Versuchszweck und zur anderen Hälfte als Kontrolle dienten.

2. Versuchsanordnung

a) Präparation und Tyrodelösung

Die Präparation und Befestigung des Herzens an der von Scheibe und Niemer (37) modifizierten Straub - Kanüle wurde schon bei Dohrn (38) ausführlich beschrieben. Außerdem wurde das Herz in der schon beschriebenen Weise (38) mit brennstoffreier, sauerstoffgesättigter Tyrodelösung folgender Zusammensetzung durchströmt:

NaCl	0,65 %	$CaCl_2$	0,02 %
KCl	0,02 %	$NaHCO_3$	0,07 %
$MgCl_2$	0,01 %	NaH_2PO_4	0,005 %

alle Substanzen pro analysi!

Die Angaben beziehen sich auf die kristallwasserfreie Trockensubstanz. Die Wasserstoffionenkonzentration der Lösung wurde jeweils auf pH = 7,8 eingestellt. Die Gefrierpunktserniedrigung betrug $0,43^{o}$, der osmotische Druck p_t = 5,65.

Das präparierte Herz wurde in eine feuchte Kammer gebracht und durch eine kleine Klemme mit dem Schreibhebel eines Kymographen verbunden, um die Hubhöhe als Maß seiner Kontraktionskraft zu registrieren.

b) Präparation der Herzen zur Bestimmung der Gewebsatmung und der energiereichen Phosphate

Für die Atmungsversuche wurden die durchströmten Herzen von den Kanülen abgenommen und nach Entfernung der Vorhöfe bis zur Weiterverarbeitung in eisgekühlte Tyrodelösung gebracht. Frische Herzventrikel für die Kontrollversuche wurden nicht erst auf eine Kanüle präpariert, sondern sofort nach Öffnung des Frosches von den Vorhöfen abgetrennt.

Zur Bestimmung der energiereichen Phosphate wurden frische und durchströmte Herzen vorsichtig mit einer Pinzette an den Vorhöfen gefaßt, so daß der herunterhängende Ventrikel schlagartig mit einer Kühlzange (39) in flüssiger Luft eingefroren werden konnte.

c) Wechsel von Anoxybiose zur Oxybiose

Zur Untersuchung der energiereichen Phosphate im Herzmuskel unter anoxybiotischen Verhältnissen wurden die extracorporal schlagenden Herzen in ein sauerstoffreies Milieu gebracht. Es mußten zu diesem Zweck die Kanülenflüssigkeit und die, die Herzen umgebende, feuchte Kammer mit Pyrogallol-gewaschenem N_2 durchströmt werden. Ein vollständiger Herzstillstand trat nach 1 - 2 Stunden ein. Weiterhin wurde das Verhalten dieser anoxybiotisch stillstehenden Herzen nach erneuter O_2-Zufuhr beobachtet. Es war dabei gleichgültig, ob der Sauerstoff in die Kanülenflüssigkeit oder von außen an das Herz herangebracht wurde.

d) Anoxybiotische Phase am Skelettmuskel

Zum Vergleich dieses Anoxybioseexperimentes mit dem Verhalten eines Skelettmuskels unter denselben Bedingungen wurde ein Froschsartorius mit Nervus ischiadikus präpariert und - in Ermangelung der autonomen Herzinnervation - unter N_2-Atmosphäre eine 1/2 Stunde lang alle 5 Sekunden durch einen Induktionsstromstoß gereizt. Die Elektroden berühr-

ten dabei den Nerven, während der Muskel mit einem Gewicht von 1 g belastet war. Nach 15. Min. waren die Muskeln meistens schon so sehr ermüdet, daß keine Kontraktionen auch auf verstärkten Reiz hin mehr erfolgten.

e) Verarmung der Herzen an Substraten, Cofermenten und Vitamin K

Die präparierten Herzen arbeiteten in der feuchten Kammer 15 - 18 Stunden und wurden während dieser Zeit mit etwa 1000 ml der beschriebenen Tyrodelösung durchströmt. Die sich innerhalb dieser Durchströmungszeit einstellende Hypodynamie wurde durch Registrierung der Kontraktionsamplituden des frischen und des hypodynamen Herzens am Kymographen aufgezeichnet. Für die Versuche wurden nur solche Herzen verwendet, die nach dieser Zeit noch eine regelmäßige Schlagfrequenz aufwiesen.

Die auf diese Weise an Inhaltsstoffen verarmten Herzen waren nun die Testobjekte für die verschiedenen Versuche. Einmal konnte durch Zugabe von Substraten und Cofaktoren der oxydativen Phosphorylierung - die am frischen Herzen keine Wirkung zeigten - ein im hypodynamen Herzen bestehender Mangel an diesen Stoffen nachgewiesen werden, wenn nach ihrer Substitution eine Zunahme von Hubhöhe und Schlagfrequenz zu verzeichnen war. Außerdem konnten die Herzen in den verschiedenen Zuständen einer direkten Analyse auf energiereiche Phosphate oder der Bestimmung ihrer mitochondrialen Atmungsaktivität unterzogen werden.

f) Untersuchung der Vitamin-K-Wirksamkeit

Im Mittelpunkt der Arbeit steht die Untersuchung der Wirksamkeit eines Chinonderivates, des Phyllochinons, auf die hypodynamen Herzen. Die freundlicherweise von der Firma Hoffmann - La Roche A.G. unentgeltlich zur Verfügung gestellte Substanz wurde, wie bei Dohrn beschrieben, durch Ultraschall in der Tyrodelösung emulgiert und nach Überprüfung des p_H-Wertes in die Herzkanülen gegeben. Die Wirkung auf die Herzkontraktion wurde kymographisch eine Stunde lang beobachtet. Darauf erfolgte die Bestimmung der energiereichen Phosphate in den Her-

zen, die eine positiv inotrope Wirkung gezeigt hatten. Die Phyllochinonkonzentration betrug in diesen Versuchen $1,33 \times 10^{-4}$ Mol (38).

g) Messung der isometrischen Kontraktionskraft des Herzmuskels

Als Ergänzung zu unseren Befunden wurden freundlicherweise von Herrn Professor Dr. H. Reichel und Herrn Privat-Dozent Dr. A. Bleichert (Physiolog. Inst. d. Universität Hamburg) genaue quantitative Messungen des isometrischen Kontraktionsablaufs der Herzen an einem optischen Rotationskymographen durchgeführt. Hierzu wurden hypodyname Herzmuskelstreifen von etwa 20 - 30 mg Gewicht und 5 - 6 mm Länge präpariert und in einem sauerstoffgesättigten Tyrodebad ca. 1 Stunde lang im Abstand von 2 oder 3 Sekunden mit Rechteckreizen beschickt. Nach dieser Zeit hatte sich die auf jeden Reiz hin entwickelte Kontraktionskraft auf eine konstante Größe eingestellt, die den Ausgangswert des Versuchs bildete. Nun wurde das Tyrodebad gegen ein solches mit Phyllochinonzusatz ausgewechselt und die eintretende Änderung des Kontraktionsverhaltens 1 Std. lang in Abständen von 5 - 10 Minuten optisch registriert.

h) Lähmung des Froschherzens durch Acetylcholin

Um die Wirkung des Phyllochinons auf den Energiehaushalt der Herzmuskelzelle noch zu unterstreichen, wurde in einigen dieser Versuche die ATP-verbrauchende Kontraktionstätigkeit der Herzen durch Acetylcholin unterbunden und so ein erheblicher Rückgang der Dephosphorylierungsrate erzielt. Analysenreines Acetylcholin rief in einer Konzentration von 10^{-5} Mol und einer weiteren, nicht genau bestimmbaren Verdünnung durch den Kanülen- und Ventrikelinhalt einen sicheren Stillstand der Herzkontraktion hervor. Nach 2 - 3 Minuten wurden dann die Herzen zur Analyse eingefroren. Wir führten diesen Versuch mit frischen und hypodynamen Herzen, sowie mit hypodynamen Herzen nach vorheriger Zugabe von Phyllochinon, durch.

3. Gewebeaufbereitung zur Analyse

Zur quantitativen Bestimmung der energiereichen Phosphate im Froschmyocard mußte eine Möglichkeit gefunden werden, den raschen Zerfall von ATP und KP während des Aufbereitungsganges zu verhindern. Am geeignetsten erschien die Unterbrechung der Stoffwechselvorgänge zu dem gewünschten Zeitpunkt durch Einfrieren der Herzen in flüssigem Sauerstoff.

Wollenberger et al. (39) beschrieben eine Methode zur besonders schnellen Abkühlung von Geweben. Sie konstruierten eine Zange, zwischen deren, durch flüssigen Sauerstoff vorgekühlten Aluminiumbacken Gewebeteile in Sekundenbruchteilen zusammengepreßt und eingefroren werden können. Eine solche Kühlzange wurde auch für diese Versuche verwendet. Ihre Backen bestanden aus Aluminiumblöcken von jeweils 4,5 x 2 x 1,5 cm Durchmesser. Die mit diesem Instrument eingefrorenen und zusammengepreßten Gewebestückchen waren in diesem Zustand leicht in einer mit flüssigem O_2 vorgekühlten Reibschale zu zermahlen und zusammen mit ein wenig flüssigem O_2 in die Kölbchen der Gefriertrocknungsanlage zu füllen. Es ist unbedingt notwendig, den Muskelbrei während dieses ganzen Aufbereitungsganges bis zum völligen Wasserentzug in gefrorenem Zustand zu erhalten, da schon kurzzeitiges Auftauen einen starken ATP- und KP-Zerfall zur Folge hat.

Im Vergleich zu den Befunden Wollenbergers konnten allerdings nicht die gleichen großen Unterschiede im ATP- und KP-Gehalt der Gewebestücke festgestellt werden, die einmal mit und einmal ohne Zange eingefroren waren. Die größte Differenz ergab sich bei der Kreatinphosphatanalyse des Skelettmuskels, die - ohne Zange durchgeführt - einen um 11 % niedrigeren Wert ergab (s. Tab. 1, nächste Seite). Diese gegenüber Wollenberger geringeren Unterschiede sind sicher auf die in diesem Fall kleineren Gewebestücke zurückzuführen.

	Zange	ohne Zange	%
ATP	22,0 µ Mol/g	22,5 µ Mol/g	+ 2,2
KP	58,5 µ Mol/g	52,0 µ Mol/g	- 11,2

Tab. 1: Vergleich des ATP- und KP-Gehaltes eines ohne und eines mit Kühlzange eingefrorenen Froschgastrocnemius. Mengenangabe: µ Mol/g Trockenpulver.

	Zange	ohne Zange	%
ATP	21,1 µ Mol/g	23,4 µ Mol/g	+ 10,9
KP	28,2 µ Mol/g	26,3 µ Mol/g	- 6,8

Tab. 2: Vergleich des ATP- und KP-Gehaltes von jeweils zehn lyophilisierten Froschherzen, die einmal mit und einmal ohne Kühlzange eingefroren worden waren. Mengenangabe: µ Mol/g Trockenpulver.

4. Stickstoffanalyse

Zur Mikroanalyse nach Kjeldahl (40) wurden 5 mg des lyophilisierten Trockenpulvers 1-2 Stunden lang mit 4 ml konz. H_2SO_4 p.a. und einer Spatelspitze Selenkatalysator (nach Wieninger) verascht. Destillation des Veraschungsproduktes mit der 5fachen Menge NaOH p.a. der verwendeten H_2SO_4. Als Vorlage dient 10 ml 0,5 % H_3BO_3 und 3 Tr. Tashiro-Mischindikator. Das in der Vorlage aufgefangene NH_4OH wird mit n/100 HCl titriert.

5. Messung der Atmung des homogenisierten Herzens

a) Homogenisation

Die Herzmuskulatur wurde im "Ultraturrax"-Homogenisator mit 1 ml Phosphatpuffer auf 100 mg Gewebe homogenisiert.

Zusammensetzung des Puffers:

3,2 g KH_2PO_4 und 6,3 g $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$ ad 1000 ml, auf p_H 7,4 eingestellt. Für eine möglichst schonende Homogenisation war es wichtig, bei einer Temperatur von 0° C den Homogenisator nur zweimal ganz kurz (einige Sekunden!) in das Material zu tauchen.

b) Atmungsmessung mit der Warburg-Technik

Die Atmungsaktivität des Homogenates wurde manometrisch mit dem Warburgapparat gemessen:

Reaktionsansatz:	Kölbchen von 5 ml Inhalt	
	Hauptraum:	1,0 ml Homogenat
	Nebenraum:	0,4 ml Cofermentlösung
	Einsatz:	0,2 ml KOH (zur CO_2-Absorption)
Cofermentlösung:	Cytochrom c	1×10^{-5} Mol
	ATP	5×10^{-4} Mol
	DPN	2×10^{-4} Mol
	$MgCl_2$	6×10^{-3} Mol

Die Sauerstoffaufnahme des Homogenates wurde bei dem angegebenen p_H von 7,4 und bei einer Temperatur von 32° C eine Stunde lang alle 10 Minuten abgelesen. Die in den einzelnen Versuchen getesteten Brennstoffe (Fruktose, Glucose, ß-Hydroxybutyrat, Pyruvat und Malat) wurden in den angegebenen Konzentrationen der Cofermentlösung zugesetzt. Zur Testung der Phyllochinonwirkung mußte die genau abgewogene Substanz mit einem aliquoten Teil des Homogenates so lange geschüttelt werden, bis sie von der Flüssigkeit völlig aufgenommen war. Die wirksame Konzentration betrug auf diese Weise in den verschiedenen Versuchen 2×10^{-2}, 8×10^{-3}, 8×10^{-4} Mol. In einem weiteren Versuch wurde die Wirkung von Menadion auf die O_2-Aufnahme des frischen Herzmuskels mit den Ergebnissen der Phyllochinonversuche verglichen. Menadion wurde in einer Konzentration von $7,4 \times 10^{-3}$ und $7,4 \times 10^{-4}$ Mol eingesetzt.

6. ATP- und KP-Analyse

Das auf die beschriebene Weise gewonnene Trockenpulver wurde nun zur enzymatischen Analyse auf ATP und Kreatinphosphat (41,42) verwendet. Gegenüber früheren Angaben wurde die Extraktionsmethode etwas variiert: Ein Ansatz enthielt etwa 100 mg Trockenpulver und 5 ml $HClO_4$ (6 %ig) bei 0° C, zu dem anschließend zur Neutralisation 1 ml einer 1 Mol Triäthanolamin und 1,3 Mol K_2CO_3 enthaltenden Pufferlösung hinzugefügt wurde. Der mit $\pm$ 2 % angegebene Fehler dieser enzymatischen

Methode ließ sich reproduzieren: Zwei getrennte Analysen von je 80 mg Trockenpulver derselben Froschserie ergaben praktisch dasselbe Resultat:

	Analyse I	Analyse II	% Abweichung vom Mittel
ATP	15,5 µ Mol/g	15,3 µ Mol/g	± 0,6
KP	16,4 µ Mol/g	17,0 µ Mol/g	± 1,7

Ein Vergleich mit den bisher üblichen Bestimmungsmethoden für ATP und KP ergab folgendes Bild:

	enzymatisch	chemisch	% Abweichung der chemischen Methode
ATP	15,4 µ Mol/g	19,3 µ Mol/g	+ 25,3
KP	16,7 µ Mol/g	13,9 µ Mol/g	- 16,8

Dabei wurde ATP als "7-Minutenphosphat" nach Lohmann - Jendrassik (43) und KP nach Alexeewa (44) bestimmt. Das Ergebnis bestätigt die bekannten Einwände gegen die genannten Methoden: Durch die Säurehydrolyse zur Bestimmung des 7-Minuten-Phosphates werden neben ATP noch andere labile Phosphate gespalten, die in diesem Falle den um 25 % zu hoch liegenden Wert erklären. Bei der Bestimmung des Kreatinphosphates nach Alexeewa geht ein Teil des KP in Kreatin über und entzieht sich so dem Nachweis als Kreatinin. Dadurch kommt in diesem Fall der zu niedrig liegende Wert zustande.

7. Die histologische Untersuchung der Froschherzen

Zur Beobachtung möglicher morphologischer Veränderungen des Myocards nach dem Zusatz von Phyllochinon, wurden uns freundlicherweise von Herrn Professor Dr. R. Wetzstein (Anatomisches Institut der Universität München) histologische Präparate der Herzen in den verschiedenen Aktivitätszuständen angefertigt. Zu diesem Zweck wurden zwei Serien von frischen (a), hypodamen (b) und hypodynamen Herzen nach Reaktivierung

durch Phyllochinon (c) (siehe Abb. 29) nach Susa in der Diastole fixiert, geschnitten und mit Haematoxylin-Eosin gefärbt. Die Auswertung dieser Präparate erfolgte mit einem Integrationsokular, um das Verhältnis der zellulären Anteile des mikroskopischen Bildes zur Größe des extrazellulären Raumes zu bestimmen und damit einen Maßstab für den Grad der Myocarddilatation zu erhalten.

VERSUCHSERGEBNISSE

1. Phyllochinon und der isometrische Kontraktionsablauf des Herzens

Die Ausgangssituation der vorliegenden Untersuchungen ist als Ergebnis der Dohrn'schen Arbeit klar umrissen (40): Durch Zufuhr von Chinonen, speziell Phyllochinon, ist es möglich, die Kontraktionsarbeit überlebender hypodynamer Froschherzen zu reaktivieren. Diese Tatsache soll zu Anfang dieser Arbeit nochmals demonstriert werden, und zwar durch genauere physiologische Messungen des isometrischen Kontraktionsablaufes hypodynamer Herzen und der Wirkung, die Phyllochinon an ihnen zu entfalten vermag.

Die Untersuchungen wurden uns freundlicherweise von Herrn Professor Dr. H. Reichel und Herrn Privat Dozent Dr. A. Bleichert (Physiologisches Institut d. Universität Hamburg) durchgeführt. In oben angegebener Weise (S. 23) präparierte Muskelstreifen aus hypodynamen Herzen wurden aerob etwa eine Stunde lang mit Rechteckreizen im Abstand von 2 - 3 Sekunden beschickt, bis die jeweils entwickelte Kontraktionskraft ein konstantes Niveau einhielt. Diese am optischen Rotationskymographen registrierte Kontraktionskurve (Kurve a in Abb. 12) bildete die Ausgangsgröße, mit der die Kontraktionsleistung der Herzmuskelstreifen nach Phyllochinonzugabe verglichen werden konnte. Aus Abb. 12 geht deutlich hervor, daß die Kontraktionsgeschwindigkeit innerhalb von 20 Minuten nach der Vitamin-K-Zugabe ständig ansteigt und daß die Kontraktionsamplitude nach Ablauf dieser Zeit ein um 75 % angehobenes Niveau erreicht, um dann langsam wieder abzufallen. Außerdem ist Abb. 12 zu entnehmen, daß ebenso wie die Kontraktionskraft, also die Höhe der mechanographischen Kurve, auch die Systolendauer nach der Phyllochinongabe zunimmt, wodurch ein zweifacher physiologischer Nachweis einer positiv inotropen Leistungssteigerung des kontraktilen Apparates erbracht wird.

Alle Anzeichen sprechen dafür, daß auch die abgesunkene Schlagfrequenz hypodynamer Herzen durch Phyllochinon angehoben wird, obwohl eine elektrophysiologische Differenzierung noch nicht durchgeführt werden konnte.

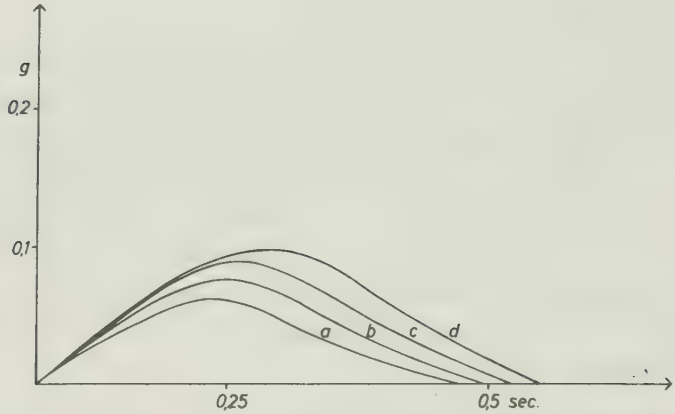


Abb. 12: Isometrische Kontraktionskurven eines hypodynamen Froschherzens. a = ohne Phyllochinon, b = 5 Min., c = 10 Min., d = 20 Min. nach Zugabe von $1,4 \times 10^{-4}$ Mol Phyllochinon.

Es wurde durch dieses Experiment noch einmal nachgewiesen, daß eine Reaktivierung der Kontraktionskraft hypodynamer Herzmuskelzellen durch Zugabe von Phyllochinon erreicht werden kann. Dohrn hatte bereits gezeigt, daß ein solcher Effekt am frischen Herzen nicht beobachtet wird.

Da nun nach den bereits erwähnten Arbeiten von Martius ein Angriffspunkt des Phyllochinons innerhalb der Atmungskette als wahrscheinlicher Vermittler der oxydativen Phosphorylierung zu vermuten ist, ergibt sich nun die Frage, ob im vorliegenden Fall ein solcher Einfluß dieses Vitamins auf die Atmungskettenphosphorylierung einem biochemischen Nachweis zugänglich ist. Hiermit wäre dann eine physiologisch meßbare Änderung der biologischen Funktion einer Zelle durch ihre unterschiedliche Stoffwechselleistung erklärt.

2. Die Verarmung des hypodynamen Herzens

Die Verarmung des nach Durchströmung und extracorporaler Tätigkeit hypodynamen Froschherzens an Chinonen und niedermolekularen Stoffen,

die sich leicht ausspülen lassen, ist der erste physiologische Befund Dohrns (38), den es chemisch zu erhärten galt. Aus Tab. 3 geht hervor, daß der N_2-Gehalt des verarmten gegenüber dem des frischen Herzens angestiegen ist. Diese Tatsache ist sicher so zu deuten, daß während der Verarmungsperiode, in der das Herz ohne äußere Brennstoffzufuhr extracorporal schlägt und seine Stoffwechselendprodukte in die ständig durchströmende Tyrodelösung verliert, die Mehrzahl der intrazellulär zur Verfügung stehenden, nicht eiweißartigen Stoffe, wie Glucose, deren phosphorylierte Metaboliten, Glycogen, Fette usw., verbraucht werden, wohingegen die Konzentration der stickstoffhaltigen Eiweißkörper und Nukleinsäuren im Verhältnis hierzu immer mehr ansteigt. Ganz allgemein scheint also die Herzmuskelzelle während der Durchströmung diejenigen Stoffe mit dem höchsten Turnover und jene niedermolekularen, die sich leicht ausspülen lassen, zuerst zu verlieren. Hierzu würde man außer den genannten verbrennbaren Substraten auch eine Reihe von Cofaktoren der enzymatischen Reaktionen rechnen müssen.

Vers. Nr.	frisch	verarmt	%
1	10,2 g %	10,9 g %	+ 6,8
2	10,6 g %	10,7 g %	+ 0,9
3	10,0 g %	10,7 g %	+ 7,0
4	9,3 g %	10,2 g %	+ 9,6

Tab. 3: Stickstoffgehalt frischer und hypodynamer Froschherzen in % des Trockenpulvers.

3. Verarmung an Substraten

Diese Konzentrationsabnahme nicht eiweißartiger Inhaltstoffe läßt sich nun im einzelnen biochemisch nachweisen. Für die vorliegende Arbeit waren vor allem die mit dem Energiestoffwechsel im Zusammenhang stehenden Substrate von Interesse, und so wurde untersucht, welchen Einfluß Glucose, Fruktose, Pyruvat und Malat sowie ß-Hydroxybutyrat auf

die Atmung des frischen und des hypodynamen Herzens haben. In Tab. 4 und 5 sind die Ergebnisse aufgeführt, deren Mittelwerte in Abb. 13 graphisch zusammengefaßt sind. Nur Pyruvat und Malat entwickeln am frischen Homogenat einen nennenswerten atmungssteigernden Effekt, während der hypodyname Muskel auf alle Substrate mit einer verschieden hohen Zunahme seiner Atmungsaktivität reagiert. Es scheint hier also in der Tat eine Verarmung des hypodynamen Muskels an verbrennbaren Substraten vorzuliegen.

Substrate	ohne Substrate	mit Substraten	%
Fruktose	38,2	40,9	+ 6,9
	45,3	48,6	+ 7,3
Glucose	51,9	50,3	- 3,1
Hydroxybutyrat	50,0	51,9	+ 3,9
	67,6	69,5	+ 2,9
Pyruvat und	51,9	65,1	+ 25,4
Malat	50,0	61,1	+ 22,3

Tab. 4: Atmung frischer Froschherzen unter Zusatz von verschiedenen Substraten. Dimension: µl O_2-Verbrauch pro 1 g Frischmuskel. Jeder Wert stellt das Mittel aus zwei gleichen Versuchsansätzen dar. Zusammensetzung und Konzentration von Cofermenten und Substraten im methodischen Teil.

Substrate	ohne Substrate	mit Substraten	%
Fruktose	29,8	34,6	+ 15,8
Glucose	42,0	55,4	+ 32
Hydroxybutyrat	59,4	78,8	+ 33
	42,0	58,9	+ 40
Pyruvat und	59,4	102,0	+ 72
Malat	42,0	89,4	+ 113

Tab. 5: Atmung hypodynamer Froschherzen unter Zusatz von verschiedenen Substraten. Dimension: µl O_2-Verbrauch pro 1 g Herzmuskel. Jeder Wert stellt das Mittel aus zwei gleichen Versuchsansätzen dar. Zusammensetzung und Konzentration von Cofermenten und Substraten im methodischen Teil.

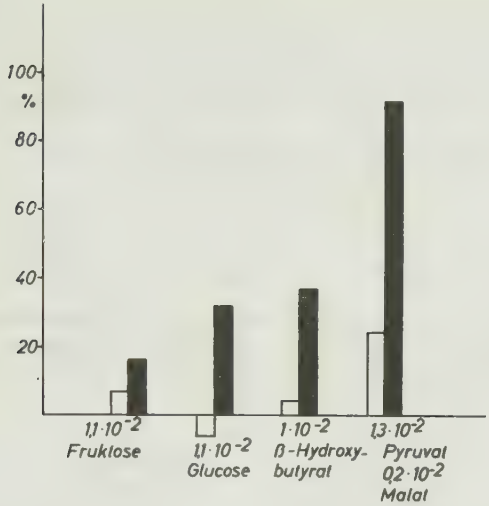


Abb. 13: Die prozentuale Atmungssteigerung frischer (weiß) und verarmter (schwarz) Herzmuskelhomogenate nach Zusatz von verschiedenen Substraten.

4. Verarmung an enzymatischen Cofaktoren

Es wurde bereits mehrfach erörtert, daß die Verarmung des durchströmten Froschherzens sich nicht nur auf den Verlust an verbrennbaren Substraten beschränken kann, sondern daß vielmehr sämtliche Substanzen, die einem höheren Turnover unterliegen oder sich leicht ausspülen lassen, in diesen Vorgang einbezogen sein müssen. Die Bestätigung dieser Vorstellung konnte in den folgenden Atmungsversuchen erbracht werden.

Tab. 6 zeigt die Sauerstoffaufnahme des homogenisierten und mit Phosphatpuffer im Verhältnis 1 : 10 verdünnten Gewebes. Es geht aus dieser Tabelle hervor, daß die Atmung des hypodynamen Herzmuskels ohne jeden Zusatz von Aktivatoren oder brennbaren Substanzen gegenüber derjenigen des frischen Homogenats um ca. 30 - 40 % gesenkt ist. Durch Hinzufügen der Cofermente Cytochrom c, DPN und Mg^{++} wurden die Atmungsaktivitäten beider Homogenate gesteigert, wobei diejenige des ver-

armten Homogenates verhältnismäßig stärker ansteigt als die des frischen. Hieraus ergibt sich bereits die relativ geringere Konzentration des hypodynamen Herzens an Cofaktoren der Zellatmung (Tab. 7):

	frischer Herzmuskel	verarmter Herzmuskel	%	
ohne Zusatz	9,9	6,0	- 39	(3 Versuche)
mit Cofermenten	53,2	36,6	- 31	(10 Versuche)

Tab. 6: Atmung frischer und verarmter Froschherzhomogenate mit und ohne Zusatz von Cofermenten (s.S. 26). Dimension: μl O_2 pro g Herzmuskelgewebe.

4	ohne Cofermente	mit Cofermenten	%
frisches Herz	9,9	53,2	+ 438
verarmtes Herz	6,0	36,6	+ 506

Tab. 7: Steigerung der Atmung frischer und hypodynamer Froschherzen durch Zusatz von Cofermenten (S. 26). Dimension: μl O_2-Verbrauch pro g Herzmuskel.

Außerdem läßt ein Vergleich der drei Kurvenverläufe in Abb. 14, (siehe nächste Seite) folgenden Unterschied deutlich werden: Der Sauerstoffverbrauch des frischen Herzmuskelbreis ohne Cofermentzusatz ist am Anfang des Versuchs noch verhältnismäßig hoch und fällt später auf eine viel niedrigere Zuwachsrate ab. Nach dem Zusatz der Cofermente zum gleichen Homogenat bleibt ein solcher Abfall der Atmungsaktivität während der Beobachtungszeit aus. Hieraus kann geschlossen werden, daß während der Dauer des Versuchs aus den atmenden Partikeln die gut löslichen DPN- und Cytochrom c-Moleküle verloren gehen (entweder abgebaut werden oder einer zunehmenden Verdünnung anheimfallen), da diese Erscheinung durch einen Cofermentzusatz zum Reaktionsmilieu verhindert werden kann. Da

andererseits das verarmte Homogenat einen solchen Abfall der Atmungsaktivität während der Beobachtungszeit nicht zeigt (Abb. 14), sondern hier die Sauerstoffaufnahme mit erniedrigter aber konstanter Geschwindigkeit abläuft, beweist diese Tatsache den von vorneherein bestehenden Cofermentmangel (in diesem Fall DPN- und Cytochrom c-Mangel) der hypodynamen Herzen.

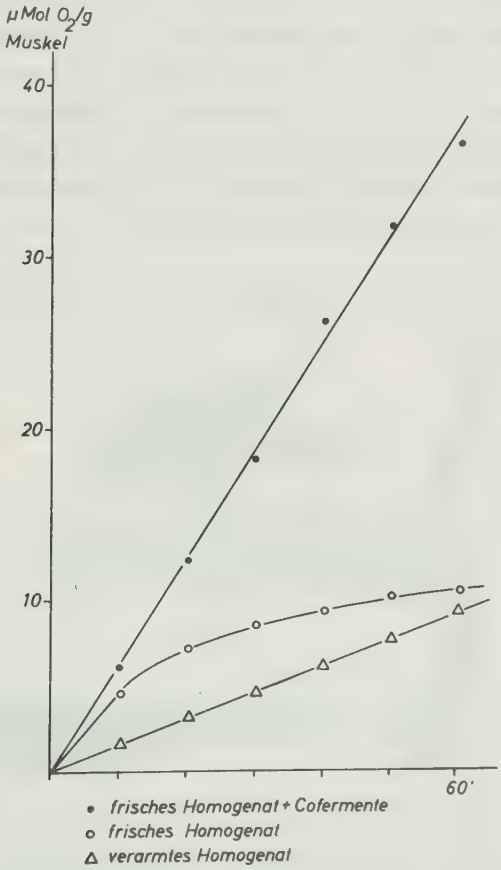


Abb. 14: Der Atmungsverlauf frischer und verarmter Herzhomogenate ohne jeden Zusatz im Vergleich zur Atmung eines frischen Homogenates nach Zugabe von Cofermenten (Cyt. c, ATP, DPN, $MgCl_2$, s.S.26).

5. Analogie der Vorgänge der Zellatmung mit jenen der Herzkontraktion

Es konnte bisher festgestellt werden, daß die hypodyname Herzmuskelzelle eine verminderte Zellatmung besitzt und daß offenbar ein Verlust von Substraten und Cofaktoren hierfür verantwortlich ist. Diese Veränderungen innerhalb der Zelle stellen also die Ursache der Hypodynamie dar. Es sollte darum möglich sein, durch Zufuhr der fehlenden Substrate und Cofaktoren von außen her wenigstens einen Teil der ursprünglichen Kontraktionskraft des Herzens wiederherzustellen. Daß dies in der Tat gelingt, wurde schon von Dohrn demonstriert. Er konnte an einem großen Untersuchungsmaterial zeigen, daß Fruktose die Schlagamplitude hypodynamer Herzen nur um durchschnittlich 8 - 9 % steigert, während sie am frischen Herzmuskel keinerlei Wirkung zeigt.

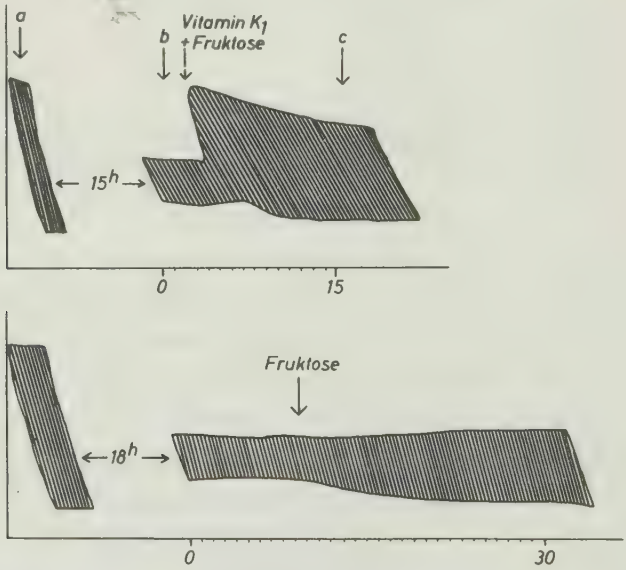


Abb. 15: Zeichnerische Darstellung typischer Kymogramme, aus denen die Wirkung von Fruktose und Fruktose + Vitamin K auf das isolierte hypodyname Froschherz hervorgeht. a = Schlagamplitude des frisch präparierten Herzens, b = Schlagamplitude des hypodynamen Herzens nach Durchströmung während eines angegebenen zeitlichen Intervalls, c = Schlagamplitude nach Reaktivierung der Herzleistung.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit fand sich, daß Glucose und Fruktose in diesem Sinne die gleiche Wirkung aufweisen wie sie aus dem unteren Kymogramm in Abb. 15 (s. S. 36) hervorgeht.

Verwendet man niedermolekulare Metaboliten der Glukose wie Pyruvat und Malat, so tritt eine Restitution der Kontraktionskraft und der Schlagfrequenz noch wesentlich schneller und stärker ein. Dies war zu erwarten, da auch die Zellatmung durch diese Stoffe im frischen und hypodynamen Zustand am stärksten stimuliert wird (Abb. 13, s. S. 33). Es ist typisch, daß die Schlagamplitude nach Zufuhr dieser Substanzen sofort zunimmt, während die Herzen nach einer Zugabe von Cofaktoren wie DPN und Cytochrom c offenbar eine Weile benötigen, um sich auf die neuen Konzentrationsverhältnisse der Cofaktoren umzustellen (Abb. 16 und 17). Dasselbe Phänomen konnte Dohrn nach Zufuhr von ATP zu hypodynamen Herzen beobachten. Versprille (49) beschreibt in einer neueren Arbeit denselben Effekt.

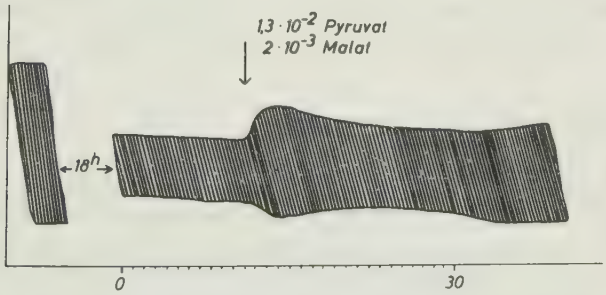


Abb. 16: Zeichnerische Darstellung eines Originalkymogramms, aus dem die Wirkung von Pyruvat und Malat auf das isolierte hypodyname Froschherz hervorgeht.

Die Cofaktoren der Atmungskette DPN und Cytochrom c haben schon nach relativ kurzer Durchströmungszeit des Herzens einen positiv inotropen Effekt auf die Schlagamplitude. Nach 4 - 6 Stunden ist ihre Wirkung bereits deutlich nachweisbar, während diese Substanzen auf die Kontraktion des frischen Herzens keinerlei Einfluß haben (Abb. 17).

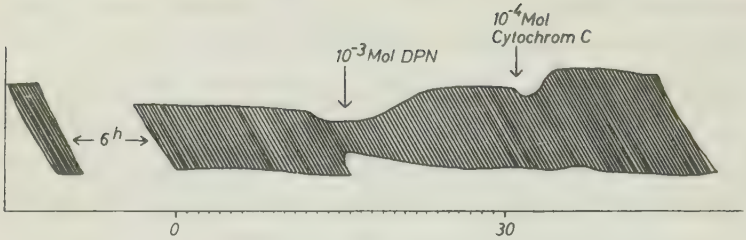


Abb. 17: Zeichnerische Darstellung eines Originalkymogramms mit dem Beispiel einer DPN- und Cytochrom c-Wirkung auf das isolierte hypodyname Froschherz. Zeiteinteilung in Minuten.

Diese Befunde zeigen sehr eindrucksvoll, daß die rein physiologisch am Kymographen beobachtete Hypodynamie der Froschherzen auf faßbare biochemische Veränderungen innerhalb des Energiestoffwechsels zurückgeführt werden können. Die Hypodynamie eines extracorporal durchströmten Herzens hat also seine Ursache sicher zu einem Teil in einem Konzentrationsverlust an endogenen Brennstoffen und Cofaktoren.

6. Verarmung an Chinonen (Phyllochinon)

Das Phyllochinon oder sein in der Zelle wirksames Derivat gehört in die Gruppe der Stoffe, die dem Herzen im Durchströmungsversuch entzogen werden, und es entscheidet nur die Größe seines Stoffwechselturnovers darüber, ob ein Mangel dieses Cofaktors noch innerhalb der Überlebenszeit des extracorporal schlagenden Herzens demonstrierbar wird.

Die rein physiologische Wirkung des Vitamins K auf das hypodyname Froschherz ist bereits von Dohrn (38) eingehend beschrieben worden. Er fand als Mittelwert einer großen Anzahl von Versuchen einen Amplitudenanstieg von 29 % nach Zugabe einer $1,36 \times 10^{-4}$ molaren Phyllochinonemulsion, während am frischen Herzen keine Wirkung zu erzielen war. Es scheint das durchströmte Herz also tatsächlich auch an diesem fettlöslichen Vitamin zu verarmen, da durch eine Substitution dieses Stoffes eine kymographisch registrierbare teilweise Restitution der Herzkraft zu erreichen ist.

Wenn es nun gelänge, neben diesen äußerlich sichtbaren Zeichen einer Reaktivierung der Herzarbeit auch die Ankurbelung des Energiestoffwechsels nach Zugabe dieser Substanz biochemisch nachzuweisen, so wäre damit ein bisher nicht vorhandenes einfaches Testobjekt zur Untersuchung solcher Chinone auf ihre spezifische Wirksamkeit innerhalb der oxydativen Phosphorylierung gewonnen.

Tabelle 8 zeigt, welchen Einfluß Phyllochinon in verschiedenen Konzentrationen auf die Atmung eines frischen Herzhomogenates ausübt. Bis zu einer molaren Konzentration von $7,8 \times 10^{-3}$ wird die Gewebeatmung nicht wesentlich beeinflußt. Erst bei höherer Molarität wirkt Phyllochinon atmungssteigernd; möglicherweise durch Abbau der Verbindung und Oxydation der Seitenkette.

Phyllochinon-konzentration	ohne Phyllochinon	mit Phyllochinon	% Steigerung der Atmung
$2,1 \times 10^{-2}$	32,4	36,8	+ 13,7
	38,2	51,7	+ 35,3
	45,3	49,0	+ 8,3
$7,8 \times 10^{-3}$	68,9	71,6	+ 3,9
	53,1	58,0	+ 9,3
8×10^{-4}	68,9	69,3	+ 0,6
	53,1	53,1	+ 0,1

Tab. 8: Sauerstoffaufnahme von Homogenaten frischer Herzen unter verschiedenen Phyllochinon-Konzentrationen. Dimension: µl O_2-Verbrauch pro g Herzmuskel in der Stunde.
Angabe über Cofermentzusätze im methodischen Teil.

Daß dieser vermutliche Abbau des Phyllochinons jedoch zu keiner wesentlichen Bildung von Methylnaphthochinon führt, wird durch folgenden Versuch bewiesen. Ein Zusatz von $7,4 \times 10^{-4}$ Mol Menadion zum Homogenat frischer Herzen hat eine starke Atmungshemmung zur Folge, wohingegen dieselbe Menge Phyllochinon (8×10^{-4} Mol) völlig wirkungslos geblieben war. In Tab. 9 ist das Ausmaß dieser Atmungshemmung genauer aufgeführt und in den Abb. 18 und 19 (s.S. 40 und 41) sind die verschiedenen beobachteten Einflüsse von Phyllochinon und Menadion auf die Homogenate frischer Herzen gegenüber gestellt.

Menadion-Konzentration	ohne Menadion	mit Menadion	% Hemmung der Atmung
$7{,}4 \times 10^{-3}$	59,2	5,3	- 91
$7{,}4 \times 10^{-4}$	59,2	11,2	- 81

Tab. 9: Hemmung der Sauerstoffaufnahme von Homogenaten frischer Herzen bei Gegenwart von verschiedenen Menadion-Konzentrationen. Dimension: µl O_2-Verbrauch pro g Herzmuskel in der Stunde. Die Zahlen stellen Mittelwerte von je zwei Versuchsansätzen dar. Angabe über Cofermentzusätze im methodischen Teil.

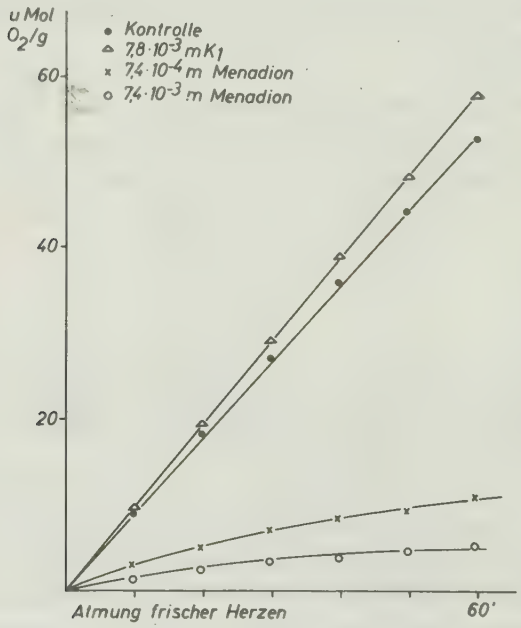


Abb. 18: Der zeitliche Ablauf der Atmung homogenisierter frischer Herzen nach Zugabe von Phyllochinon und Menadion. Angabe über Cofermentzusätze im methodischen Teil.

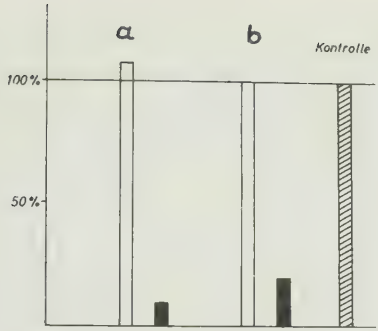


Abb. 19: Atmung homogenisierter frischer Froschherzen, weiß: nach Zusatz von Phyllochinon, schwarz: nach Zusatz von Menadion, schraffiert: Kontrolle ohne Zusatz. Molare Konzentration des Phyllochinons: a) $7,8 \times 10^{-3}$ b) 8×10^{-4}, molare Konzentration des Menadions: a) $7,4 \times 10^{-3}$, b) $7,4 \times 10^{-4}$.

Im Gegensatz zur beschriebenen Wirkung des Vitamins K am frischen Herzmuskelbrei zeigt diese Substanz am Homogenat hypodynamer Herzen einen stark hemmenden Effekt auf die Gewebeatmung. Größenordnung und zeitlicher Ablauf dieses Befundes gehen aus Tabelle 10 und Abb. 20 hervor.

Phyllochinon-konzentration	ohne Phyllochinon	mit Phyllochinon	% Atmungs-hemmung
$2,1 \times 10^{-2}$	33,2	32,8	- 1,4
	51,4	39,7	- 22,5
$7,8 \times 10^{-3}$	35,1	23,2	- 33,8
	37,3	13,9	- 62,7
	18,9	12,6	- 33,5
8×10^{-4}	35,1	25,7	- 26,8
	37,3	23,6	- 36,9
	18,9	13,7	- 27,3

Tab. 10: Sauerstoffaufnahme durch Homogenate verarmter Herzen unter verschiedenen Phyllochinon-Konzentrationen. Dimension: µl O_2-Verbrauch pro g Herzmuskel und Stunde. Die Zahlen sind Mittelwerte von je zwei Parallelversuchen. Angabe über Cofermentzusätze im methodischen Teil.

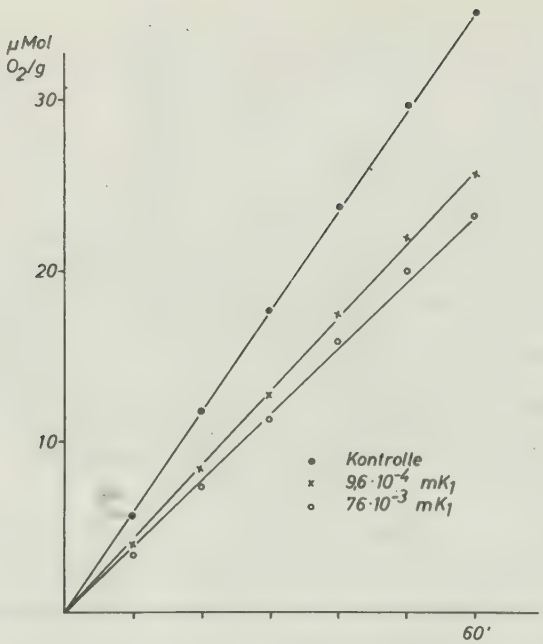


Abb. 20: Verlauf der Sauerstoffaufnahme homogenisierter hypodynamer Herzen bei Gegenwart von Phyllochinon. Kontrolle: nur Cofermente (s. 26).

Zieht man die Vorstellung von Martius heran, nach der Phyllochinon als Vermittler der ersten Phosphorylierungsstufe anzusehen ist, so müßte das Fehlen dieser Substanz eine teilweise Entkopplung der Atmungskette zur Folge haben. Die Phosphorylierung würde in diesem Fall eingeschränkt sein, während die Atmung auf einen relativ höheren Wert angehoben wäre. Eine Zufuhr von Vitamin K würde eine solche Atmungskette in ihren normalen Funktionszustand zurückversetzen, also einen Kopplungseffekt zur Folge haben. Eine solche Situation liegt wahrscheinlich im hypodynamen Herzen nach dem Verlust des Phyllochinons bzw. seiner spezifischen Wirkungsform (evtl. auch noch anderer Chinone) zugrunde. Da Phyllochinon am hypodynamen Herzen einerseits zu einer Aktivierung der Herzarbeit mit

wahrscheinlich erhöhtem Energieangebot führt, andererseits gleichzeitig ein Absinken der Zellatmung zu beobachten ist, scheint in diesem Fall ein solcher Kopplungseffekt vorzuliegen. In Abb. 30 ist noch einmal die unterschiedliche Wirkung des Phyllochinons am frischen und hypodynamen Herzen gegenübergestellt.

7. Energiestoffwechsel

Die obigen Befunde weisen auf die große Bedeutung des Vitamins K für den Energiestoffwechsel hin. Es wäre also interessant, die unmittelbare Beziehung des Phyllochinons zu der Synthese energiereicher Phosphate im überlebenden Froschherzen nachzuweisen. Zuerst soll ganz kurz auf die allgemeinen Synthese- und Abbaumöglichkeiten des ATP und des Kreatinphosphates hingewiesen werden.

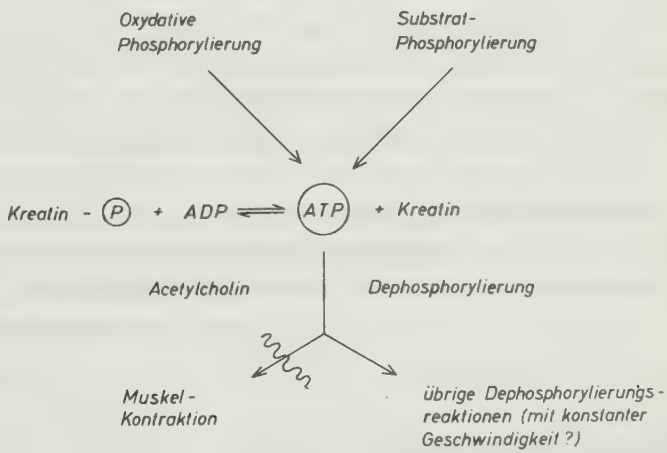


Abb. 21

Schema über konkurrierende Reaktionen beim Auf- und Abbau von ATP und Kreatinphosphat im Muskel.

In Abb. 21 ist eine schematische Übersicht über die uns bekannten Reaktionswege gegeben, die für diese Zusammenhänge der Energieproduktion und des Energieverbrauchs einer Muskelzelle von Bedeutung sind. Die oxydative Phosphorylierung und die Substratphosphorylierung liefern das ATP, den Trägerstoff der überall in der Zelle benötigten und verwertbaren chemischen Energie, dessen unzählige Abbauwege hier der Einfach-

heit halber nur in zwei Möglichkeiten unterteilt sind: Der eine Hauptweg, durch den chemische Energie der Muskelkontraktion zufließt, und der andere Weg in dem sämtliche übrigen Dephosphorylierungswege zusammengefaßt sind.

Seit langem ist der Muskelphysiologie als weiterer, für den Kontraktionsmechanismus wichtiger Energiedonator das Kreatinphosphat bekannt. Man hat jedoch nur eine einzige Reaktion entdecken können, der das KP im Rahmen des Stoffwechsels unterworfen ist: der Übertragung seiner energiereichen Phosphatgruppe auf das ADP, also der ATP-Synthese. Da diese Reaktion sehr schnell abläuft, stellt das KP einen Energiespeicher der Muskelzelle dar, der in der Lage ist, einen kontraktionsbedingten ATP-Verlust rasch wieder aufzufüllen. Dabei läuft diese Reaktion schneller ab als die glycolytischen und oxydativen Prozesse, die ja gleichfalls das entstandene ATP-Defizit wieder auffüllen würden, so daß diese erst nach dem Verbrauch des zur Verfügung stehenden KP anzuspringen brauchen, um den in der Zelle entstandenen Energieverlust durch ATP- und KP-Resynthese wieder zu beheben. Die Muskelzelle ist offenbar erst durch diese Steuerung des chemischen Energieflusses zu einer plötzlichen und anhaltenden Kontraktion ohne vermehrte Zufuhr von brennbaren Substanzen und Sauerstoff fähig, denn die erneute Produktion von chemischer Energie kann nun in die Erholungsphase des Stoffwechsels im Anschluß an die Kontraktion verlegt werden, in der bessere Durchblutungsverhältnisse herrschen und in der nun die eingegangene "Sauerstoffschuld" wieder beglichen werden kann.

8. Energiereiche Phosphate beim Wechsel der aeroben zur anaeroben Phase

a) Froschsartorius

Diese Grundmechanismen des muskulären Energiestoffwechsels sind seit langem bekannt. Erwähnt seien hierzu nur die grundlegenden Arbeiten von Lundsgaard (45) und Mommaerts (46). Wie die Tab. 11 zeigt, verliert ein unter anaeroben Bedingungen elektrisch bis zur Erschöpfung gereizter Skelettmuskel beinahe sämtliches Kreatinphosphat,

obwohl der ATP-Gehalt nur um etwa 30 - 40 % erniedrigt ist. Der gesamte Verlust an energiereichen Phosphaten beträgt 80 µ Mol/g Muskeltrokkensubstanz.

Versuch Nr.	ATP frisch	ATP gereizt	ATP %	KP frisch	KP gereizt	KP %
1	22,9	13,9	- 39,4	53,6	5,5	- 89,8
2	22,1	14,6	- 34,0	73,3	3,6	- 95,1

Tab. 11: Gehalt an energiereichen Phosphaten in frischen und in anaeroben, bis zur Erschöpfung elektrisch gereizten Froschsartorien. Dimension: µ Mol ATP und KP pro g Muskeltrockenpulver.

Hier hat also der Energiespeicher Kreatinphosphat für die Kontraktion vollständig zur Verfügung gestanden, während der noch verbleibende ATP-Rest innerhalb der Feinstruktur der Zelle an Stellen festliegt, von denen aus die Mobilisation für den Kontraktionsvorgang offenbar nicht möglich ist.

b) Froschherz

Bei der Analyse der energiereichen Phosphate des Froschherzens stießen wir zuerst auf einen Nebenbefund, der an dieser Stelle kurz erwähnt werden soll. Es konnte festgestellt werden, daß der ATP- und KP-Spiegel in den Froschherzen offenbar starken jahreszeitlichen Schwankungen unterworfen ist. In den Monaten April und Mai liegt der Spiegel von ATP und ebenso von KP etwa um 30 - 50 % höher als in der übrigen Zeit des Jahres (Abb. 22, siehe nächste Seite).

Es besteht der Verdacht, daß dieser unterschiedliche Gehalt an energiereichen Phosphaten im Froschmyocard Ausdruck einer jahreszeitlich wechselnden hormonalen oder stoffwechselmäßigen Aktivität der Amphibien ist. Außerdem ergibt sich hieraus für Untersuchungen des Froschmyocards, daß ein Vergleich von Analysenergebnissen nur innerhalb derselben Froschserie möglich ist - und auch dann nur, wenn sie in kurzem zeitlichen Abstand voneinander gewonnen wurden.

Um die Differenz des energiereichen Phosphatspiegels unter extremen Bedingungen verfolgen zu können, boten sich verschiedene Methoden der

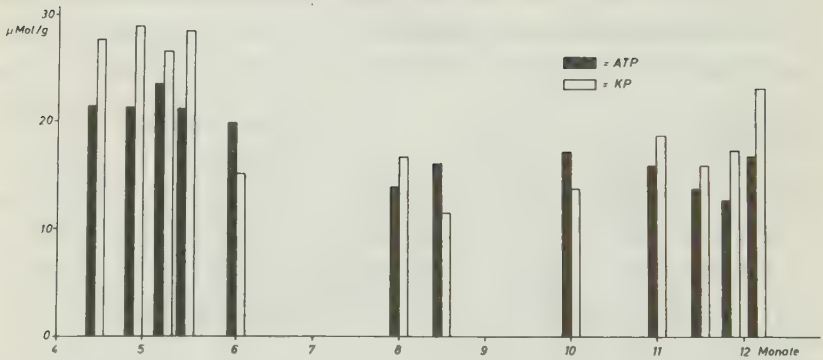


Abb. 22: Die jahreszeitlichen Unterschiede im ATP- und KP-Gehalt frischer Froschherzen. Dimension: µMol/g Trockenpulver.

Atmungshemmung an. Da jedoch ein Einfluß von CN^- und Dinitrophenol auf die enzymatische ATP- und KP-Bestimmung nicht ausgeschlossen werden konnte, blieb als zweckmäßigste Methode die Unterbrechung der Zellatmung durch ein sauerstoffreies Reaktionsmilieu übrig. Dies hatte außerdem den Vorteil, daß unkontrollierbare Begleitreaktionen innerhalb des übrigen Stoffwechsels nicht zu befürchten waren. Das Ergebnis dieser Versuche war überraschend. Auch hier zeigte sich die enorme Widerstandsfähigkeit des Kaltblütlerherzens, das erst nach etwa zweistündiger Schlagtätigkeit in sauerstoffreier Umgebung langsam zum Stehen kommt. Dieser Zeitraum ist erstaunlich, selbst wenn man berücksichtigt, daß nach dem Einschalten der N_2-Atmosphäre in der stickstoffdurchperlten Kanülenflüssigkeit noch eine geringe Menge Sauerstoff verbleibt, die erst langsam verdrängt wird. Abb. 23 zeigt ein solches Kymogramm, aus dem eindrucksvoll hervorgeht, daß nach dem Ablauf dieser Zeit durch erneute Zufuhr von Sauerstoff der Herzstillstand fast augenblicklich rückgängig gemacht werden kann.

Der Spiegel der energiereichen Phosphate verhielt sich bei diesen Experimenten folgendermaßen: Aus Tab. 12 geht hervor, daß während der zweistündigen Anoxybiose der ATP- und KP-Gehalt der Herzen gleichermaßen zurückgeht, wobei die verbleibende KP-Menge von fast 70 % jedoch

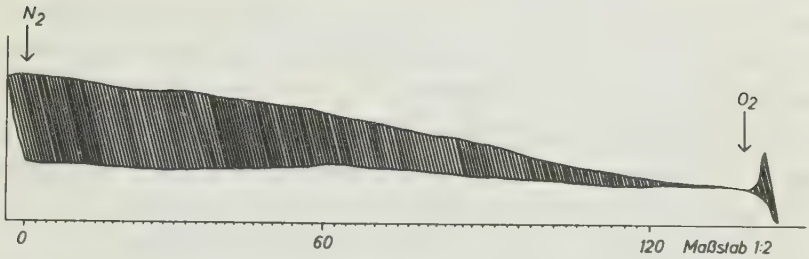


Abb. 23: Zeichnerische Darstellung eines Originalkymogramms. Isoliertes Froschherz in N_2-Atmosphäre mit Wiedereinsetzen der Herzkontraktionen nach O_2-Zufuhr. Zeiteinteilung in Minuten!

zu hoch ist, als daß daraus die Funktion des Kreatinphosphates als leicht mobilisierbarer Energiespeicher eindeutig abgeleitet werden könnte. Die von der Muskelphysiologie her bekannte und weiter oben (S. 44) nochmals in einem Experiment nachgewiesene Vorstellung von der Funktion des Kreatinphosphates als jederzeit für die Kontraktion bereitstehendes Speicherphosphat hat für den Herzmuskel offenbar nicht ohne weiteres dieselbe Gültigkeit, da in einem solchen Fall der KP-Verlust ein wesentlich höheres Ausmaß als 33 % erreichen müßte.

	ATP			KP		
Versuch Nr.	frisch	N_2	%	frisch	N_2	%
1	17,2	14,2	- 17,5	13,7	11,0	- 19,8
2	15,9	14,3	- 10,1	18,6	12,5	- 32,8

Tab. 12: Gehalt an ATP und KP in frischen Herzen nach 2stündiger Anoxybiose. Dimension: µMol/g Trockenpulver.

Andererseits müssen möglicherweise zur Interpretation des Befundes auch topochemische Gesichtspunkte herangezogen werden. Man darf annehmen, daß der Verlust an energiereichen Phosphaten in den verschiedenen Zellräumen unterschiedlich groß ist und an den Orten des höchsten Verbrauchs die größten Werte erreicht. So ist es wahrscheinlich, daß eine Kontraktion infolge ATP-Mangels nicht mehr zustande kommen kann, ob-

wohl die Analyse des gesamten Herzmuskels noch einen erstaunlich hohen Restgehalt an energiereichen Phosphaten aufdeckt.

Es war zu erwarten, daß die im Kymogramm (Abb. 23) gezeigte Reaktivierung des Herzmuskels durch Sauerstoffzufuhr auch mit einem Anstieg des ATP- und KP-Spiegels einhergeht. Und zwar muß die Erholung des oxydativen Stoffwechsels und damit die Hebung des Niveaus der energiereichen Phosphate dem Anspringen der Kontraktionstätigkeit vorausgehen. Dies bedeutet aber, daß vorübergehend das von Fleckenstein (47) entdeckte und auf Seite reproduzierte Stadium der "ungehemmten Aktivität" oxydativer Phosphorylierungsprozesse bei gleichzeitigem Fehlen der Kontraktionsbedingten ATPase-Wirkung mit einer vorübergehenden Anhäufung der energiereichen Phosphate durchschritten wird. Eine solche Kumulation des Kreatinphosphates bei gleichzeitig nur wenig erhöhtem ATP-Gehalt konnte in einem Versuch nachgewiesen werden (Tab. 13), wobei zu erwarten ist, daß dieser erhöhte Energiespiegel nach einiger Zeit normaler Herztätigkeit wieder abfällt.

ATP			KP		
frisch	N_2+O_2	%	frisch	N_2+O_2	%
15,9	17,1	+ 7,5	18,6	24,6	+ 32,2

Tab. 13: Gehalt von ATP und KP in frischen Froschherzen nach 2stündiger Anoxybiose und anschließender O_2-Zufuhr (Abb. 23). Dimension: µMol/ g Trockenpulver.

In den Abb. 24 und 25 sind diese unterschiedlichen Reaktionsweisen der Skelett- und Herzmuskulatur gegenübergestellt.

Der Konzentrationsanstieg der energiereichen Phosphate nach Sauerstoffzufuhr gegenüber dem ATP- und KP-Spiegel im anoxybiotisch stillstehenden Herzen beträgt 15,6 µMol/g Trockensubstanz (vergl. Tab. 12 und 13). Dieser Wert entspricht etwa der Wirksamkeit der oxydativen Phosphorylierung vor dem Wiedereinsetzen der Kontraktion.

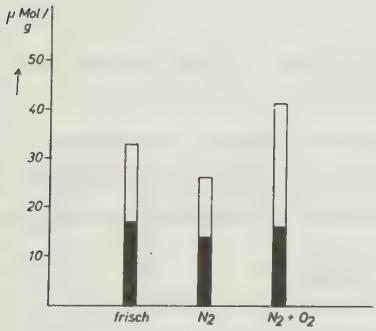


Abb. 24: Verhalten der energiereichen Phosphate bei oxybiotischer und anoxybiotischer Soffwechsellage des Herzens. Einzelheiten s. Text sowie Tab. 12 und 13.
Schwarz = ATP, weiß = KP

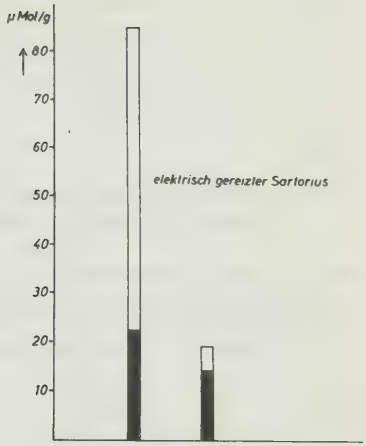


Abb. 25: Verhalten der energiereichen Phosphate nach elektrischer Reizung eines Froschsartorius unter anaeroben Bedingungen. Einzelheiten s. Text sowie Tab. 11. Dimensionen: µ Mol energ. Phosphate/g Herzmuskeltrockenpulver.
Schwarz = ATP, weiß = KP.

9. Energiereiche Phosphate im hypodynamen Zustand des Froschherzens

Da die neueren Ergebnisse der Muskelphysiologie eindeutig gezeigt haben, daß im ATP die energiereiche Substanz zu suchen ist, deren Zerfall an der Muskelfibrille eine Kontraktion der Aktomyosinmoleküle auslöst, lag es nahe, die verminderte Kontraktionsamplitude der hypodynamen Herzen vornehmlich durch einen Verlust von ATP als der primär wirksamen kontraktionsauslösenden Substanz zu deuten.

Diese ATP-Verarmung konnte in den hypodynamen Herzen chemisch nachgewiesen werden. Wie bei Dohrn betrug die registrierte Amplitudenverminderung der Herzen 70 - 80 %. Tab. 14 zeigt, daß auch der ATP-Spiegel nach der Verarmung um 20 - 30 % gesunken ist.

Vers.Nr.	frisch	verarmt	% ATP-Verlust
1	21,7	16,4	- 24,4
2	15,9	11,2	- 29,6
3	16,0	11,7	- 26,9
Mittel	17,9	13,1	- 26,8

Tab. 14: Unterschiede im ATP-Gehalt frischer und hypodynamer Herzen. Dimension: µMol/ g Trockenpulver.

Gegenüber dem Verhalten des ATP-Spiegels bedürfen die gefundenen Werte für Kreatinphosphat einer besonderen Interpretation. Sie sind durchweg sehr unterschiedlich hoch und erweisen sich im Mittelwert als angestiegen.

Vers.Nr.	frisch	verarmt	%
1	27,2	33,1	+ 24,7
2	16,7	11,3	- 32,3
3	11,5	17,5	+ 52,3
Mittel	18,5	20,3	+ 11,1

Tab. 15: Unterschiede Im Kreatinphosphatgehalt frischer und hypodynamer Herzen. Dimension: µMol/ g Trockenpulver.

Dieser Befund ist möglicherweise darauf zürückzuführen, daß der Stoffwechsel sich im hypodynamen Herzen von dem der Kontrolle durch eine weitgehende Verminderung der aus der Kontraktion resultierenden Dephosphorylierungsreaktionen unterscheidet.

Betrachtet man noch einmal das Schema in Abb. 21, so geht daraus hervor, daß eine Verminderung oder Unterbrechung der kontraktionsbedingten ATPase-Wirkung, die auch durch eine Lähmung der fibrillären Kontraktionsfähigkeit mit Acetylcholin zu erreichen ist, einen Aufstau von ATP und KP zur Folge haben muß, wenn die oxydative Phosphorylierung bei einem solchen Experiment unbeeinträchtigt bleibt und die übrigen phosphorylierenden Prozesse (wie Lynen u.a. (54) es annehmen) weiterhin mit konstanter Geschwindigkeit ablaufen. Daß dies auch für die Herzmuskelzelle zutrifft, konnten Fleckenstein u.a. (47) zeigen. Sie fanden nach einer solchen "energetisch-dynamischen Entkopplung" eines Säugerherzens eine Vermehrung des KP-Gehalts um etwa 30 %.

Die von Fleckenstein am Warmblütlerherzen gemachte Beobachtung konnte für das Froschherz bestätigt werden. Tab. 16 zeigt einen Anstieg des KP nach Acetylcholinlähmung um ebenfalls 30 %, während der ATP-Spiegel nur wenig verändert wird.

ATP			KP		
frisch	mit Acetylcholin	%	frisch	mit Acetylcholin	%
21,5	22,3	+ 4,1	27,5	37,0	+ 34,5

Tab. 16: Verhalten der energiereichen Phosphate im frischen Froschherzen nach Lähmung der Kontraktion durch Acetylcholin. Dimension: µMol/g Trockenpulver.

Somit steht auf Grund der Untersuchungen fest, daß die kontraktionsbedingte ATPase-Wirkung sehr weitgehend den Spiegel des energiereichen Phosphats im Herzmuskel beeinflussen kann. Will man Vorgänge der oxydativen Phosphorylierung an Hand von Konzentrationsunterschieden der energiereichen Phosphate beurteilen, so ist hiermit die Möglichkeit gegeben, einen der bedeutendsten Dephosphorylierungsfaktoren auszuschalten und die Aktivität der Atmungsketten Phosphorylierung zu verdeutlichen.

Unter dem Einfluß von Acetylcholin dokumentiert sich (Tab. 17) der Verlust energiereicher Phosphate im hypodynamen Herzen folgendermaßen:

ATP			KP		
frisch	verarmt	%	frisch	verarmt	%
22,3	19,4	- 13,3	37,0	31,4	- 15,2

Tab. 17: Verhalten der energiereichen Phosphate im Acetylcholingelähmten frischen und verarmten Herzen. Dimension: µMol/g Trokkenpulver.

KP nimmt um etwa 15 %, ATP um etwa 13 % gegenüber der Kontrolle ab. Insgesamt hat das hypodyname Herz gegenüber dem frischen ca. 8,5 µ Mol/g Trockenpulver an energiereichem Phosphat verloren.

10. Energiereiche Phosphate nach Reaktivierung des Herzens mit Phyllochinon (Vitamin K_1)

In den vorausgehenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Hypodynamie des Herzens offenbar ebensosehr durch den Verlust der endogenen Substrate wie durch die Konzentrationsabnahme der zellulären Cofermente, zu denen wir auch die Chinone zählten, hervorgerufen wird.

Es lag nun nahe, diese im Kymogramm der Abb. 26 noch einmal demonstrierte, statistisch gesicherte, positiv inotrope Wirkung des Phyllochinons am hypodynamen Herzen auch biochemisch zu erfassen. Da als unmittelbare Voraussetzung einer gesteigerten Kontraktionsaktivität der Herzmuskelzelle ein erhöhtes Energieangebot in Form von ATP und KP zu erwarten war, wurden Bestimmungen der energiereichen Phosphate im Phyllochinon-reaktivierten Herzen durchgeführt, und zwar einmal ohne (Tab. 18 und 19) und einmal mit (Tab. 20) Ausschaltung der Muskelkontraktion durch Acetylcholin. Erwartungsgemäß brachte nur jener Versuch, der unter Ausschaltung der kontraktionsbedingten ATPase-Wirkung durchgeführt wurde, eindeutige Ergebnisse.

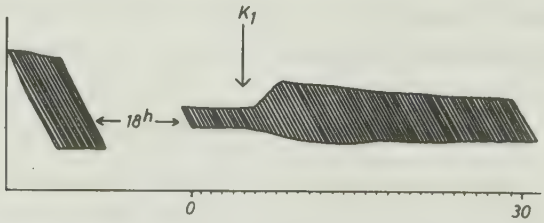


Abb. 26: Wiedergabe einer Originalkurve. Wirkung des Phyllochinons auf die Kontraktion des hypodynamen Herzens. Zeit in Minuten.

Dennoch kann man bereits aus der ersten Versuchsanordnung sehen (ohne Acetylcholin), daß durch Vitamin K_1 der ATP-Spiegel angehoben wird. Der Versuch mit Acetylcholin zeigt folgende Wirkung des Vitamin K_1 im hypodynamen Herzen: Anstieg des ATP-Spiegels um ca. 8 % und des KP-Spiegels um ca. 12 %. Insgesamt erhöht sich die Konzentration des energiereichen Phosphates um ca. 5 µMol/ g Trockenpulver. Dieser Effekt zeigt, daß Vitamin K die oxydative Phosphorylierung in den hypodynamen

Herzen katalysiert und daß die positiv inotrope Wirkung dieses Chinons mit größter Wahrscheinlichkeit über eine vermehrte Bereitstellung von ATP im Bereich der kontraktilen Elemente zustande kommt.

Vers. Nr.	verarmt	verarmt + Vit. K	%
1	18,7	19,4	+ 3,7
2	18,5	20,1	+ 8,6

Tab. 18: ATP-Gehalt hypodynamer Herzen vor und nach Zugabe von Phyllochinon. Dimension: µMol/g Trockenpulver.

Vers. Nr.	verarmt	verarmt + Vit. K	%
1	36,5	34,6	- 5,3
2	30,7	29,7	- 3,3

Tab. 19: KP-Gehalt hypodynamer Herzen vor und nach Zugabe von Phyllochinon. Dimension: µMol/g Trockenpulver.

ATP			KP		
verarmt	verarmt + Vit. K	%	verarmt	verarmt + Vit. K	%
19,4	20,9	+ 7,7	31,4	35,1	+ 11,7

Tab. 20: ATP- und KP-Gehalt verarmter Herzen vor und nach Zugabe von Phyllochinon bei vorheriger Lähmung der Kontraktion mit Acetylcholin. Dimension: µMol/g Trockenpulver.

11. Die Reaktivierung der oxydativen Phosphorylierung durch Vitamin K_1 im hypodynamen Herzen

In den Kapiteln 8, 9 und 10 wurde das Verhalten der energiereichen Phosphate bei verschiedenen Funktionszuständen des Froschmyocards dargestellt. Es soll nun versucht werden, diese Ergebnisse in einem Zusammenhang zu sehen, aus dem die Abhängigkeit der Muskelkontraktion des Herzens vom Spiegel der energiereichen Phosphate und damit vom Funktionszustand der Atmungskettenphosphorylierung hervorgeht.

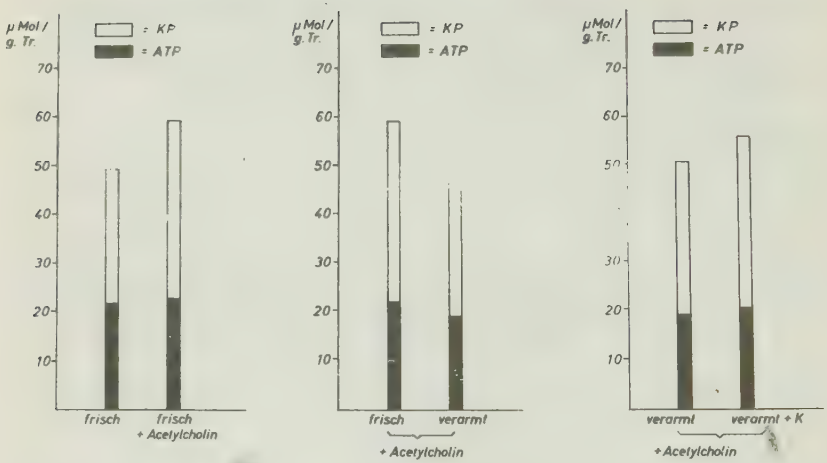


Abb. 27: Das Verhalten der energiereichen Phosphate im Acetylcholin-gelähmten Froschmyocard unter verschiedenen Versuchsbedingungen.

Vergegenwärtigen wir uns noch einmal die Tab. 12 und 13 sowie die Abb. 24. Es wurde darin nachgewiesen, daß eine Zufuhr von Sauerstoff zum zuvor anoxisch stillgestellten Myocard - bevor noch die Kontraktion wieder einsetzt - mit einem meßbaren Anstieg der energiereichen Phosphate um 15,7 µMol/ g Trockenpulver verbunden ist. Dieser Befund kann nur so gedeutet werden, daß durch die erneute Sauerstoffzufuhr der normale Funktionszustand der Atmungskette wiederhergestellt wird, ohne daß es gleichzeitig zu einem stärkeren ATP-Zerfall kommt (vorübergehend fehlender Kontraktionsreiz?). Vergleicht man nun demgegenüber den Funktionszustand der Atmungskette im frischen und verarmten Acetylcholin-gelähmten Herzmuskel (Tab. 17, Abb. 27), so ergibt sich im hypodynamen Herzen eine um 8,5 µMol/ g Trockenpulver verminderte ATP- und KP-Synthese. Die Syntheserate der normal funktionierenden Atmungskettenphosphorylierung würde in unserem Fall auf 15,7 µMol/ g Trockenpulver = 100 % beziffert werden müssen, wohingegen die Phosphorylierung im hypodynamen Herzen um 8.5 µ Mol/ g Trockenpulver = 54 % zurückgegangen wäre. Die Reaktivierung dieses eingeschränkten

Funktionszustandes durch Vitamin K_1 (Tab. 20, Abb. 27) wäre nun mit einem Anwachsen der Syntheserate um 5,2 µMol/ g Trockenpulver = 30 % energiereichen Phosphats verbunden. In Abb. 28 ist dieser Vergleich graphisch dargestellt. Es ist hiermit eine deutliche Parallelität der verschiedenen Funktionszustände der Atmungskettenphosphorylierung mit dem typischen Verhalten der Herzkontraktion unter diesen unterschiedlichen Versuchsbedingungen aufgedeckt.

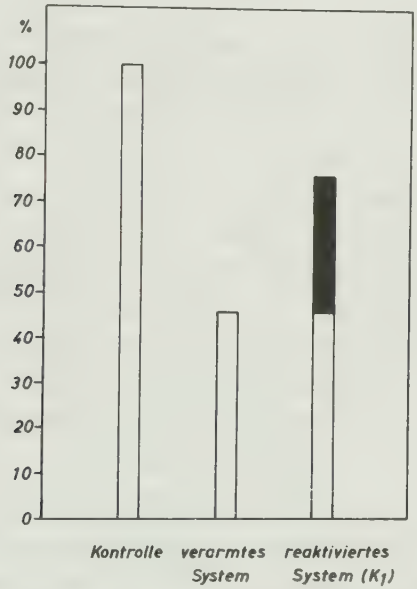


Abb. 28: Vergleich der Funktionszustände der Atmungskettenphosphorylierung unter verschiedenen Versuchsbedingungen.
Kontrolle: Δ~P (anaerob-aerob) = 15,7 µMol = 100 % (etwa oxydat. Phosphoryl.)
Verarmtes System: Δ~P (frisches-verarmtes Herz) = - 8,5 µMol = 54 % (Abnahme der oxydat. Phosphorylierung)
Reaktiviertes System: Δ~P (verarmtes Herz-verarmtes Herz + K_1) = + 5,2 µMol = 30 % (Zunahme der oxydat. Phosphoryl.)

12. Morphologische Befunde

Die vorliegenden Untersuchungen über die Wirkung aktivierender Substanzen auf das hypodyname Froschherz gehen von der Voraussetzung aus, daß sich am Herzen Einflüsse auf das zugrundeliegende Stoffwechselgeschehen jeweils in einer optisch und mechanisch leicht erfaßbaren Änderung der physiologischen Funktion dokumentieren. Auf diese Parallelität des biochemischen und des physiologischen Funktionszustandes wurde in den voraufgehenden Abschnitten eingegangen.

In diesem Kapitel sollen als ein weiteres Merkmal veränderter zellulärer Stoffwechselaktivität die äußere Form und die Größe des biologischen Objekts sowie der histologische Befund beschrieben werden. Während die Herzen im frischen Zustand mit kleinen, kontrahierten Vorhöfen und Ventrikeln in regelmäßigem Sinusrhythmus eine kräftige Schlagamplitude zeigen, ist nach einer Durchströmungszeit von 12 - 15 Stunden eine Dilatation der Kammer und vor allem der beiden Vorhöfe zu erkennen. Die Vorhöfe werden in vielen Fällen in grotesker Weise auf ein Vielfaches ihrer ursprünglichen Größe aufgebläht. Ohne auf den eigentlichen Mechanismus dieser Dilatation hier näher eingehen zu wollen, sei bemerkt, daß wahrscheinlich der herabgesetzte Grundtonus der fibrillären Zellelemente für diese Dilatation verantwortlich zu machen ist, welcher vor allem durch die Menge des angebotenen ATPs bestimmt wird.

Die Zufuhr von aktivierenden Substanzen hat regelmäßig auch einen Rückgang der Dilatation hypodynamer Herzen zur Folge. Besonders schön konnte der Einfluß des Phyllochinons im histologischen Bild gezeigt werden. Die mikroskopischen Schnitte und Photographien sowie deren Auswertung wurden freundlicherweise von Herrn Professor Dr. R. Wettstein (Anatomisches Institut der Universität München) angefertigt. Das hypodyname Herz zeigt eine deutliche Verbreiterung der extrazellulären Räume. Demgegenüber hat die Zugabe einer Phyllochinon und Fruktose enthaltenden Lösung eine deutliche Erhöhung der Kontraktionsamplitude zur Folge (Abb. 15), die mit einer auffälligen Verkleinerung der interstitiellen Räume verbunden ist (Abb. 29 c,f). In den Tab. 21 und 22 kommt

dieser Zusammenhang in Zahlenwerten zum Ausdruck. Hierfür wurde mit dem Integrationsokular der prozentuale Anteil der extrazellulären Räume gegenüber dem Anteil der zellulären Strukturen im histologischen Bild bestimmt.

frisches Herz

Nr.	Messung 1	Messung 2
1	5 %	5 %
2	3 %	5 %
3	7 %	7 %

hypodynames Herz

Nr.	Messung 1	Messung 2
1	13 %	22 %
2	21 %	20 %
3	29 %	28 %

Tab. 21: Prozentualer Anteil der extrazellulären Räume am histologischen Bild. Vergleich frischer und hypodynamer Herzen.

hypodyname Herzen

Nr.	Messung 1	Messung 2
1	64 %	71 %
2	45 %	50 %

hypodyname Herzen nach Vitamin K_1-Zugabe
(Zeitpunkt c in Abb. 15)

Nr.	Messung 1	Messung 2
1	36 %	21 %
2	20 %	22 %

Tab. 22: Prozentualer Anteil der extrazellulären Räume am histologischen Bild. Vergleich hypodynamer Herzen vor und nach Zugabe von Vitamin K_1.

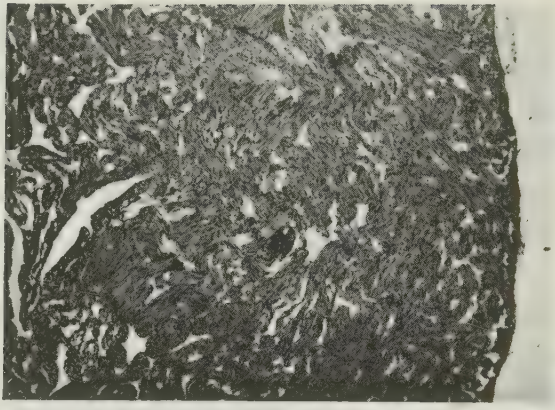
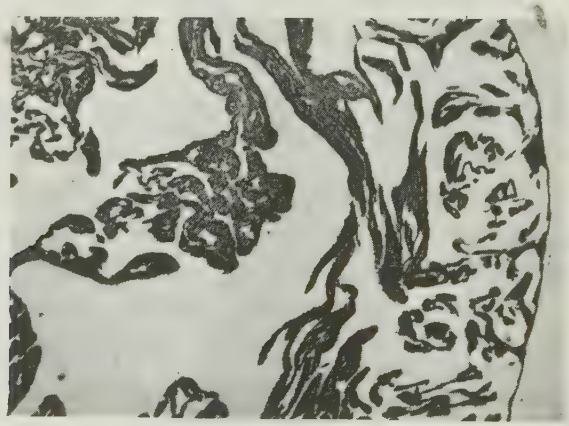
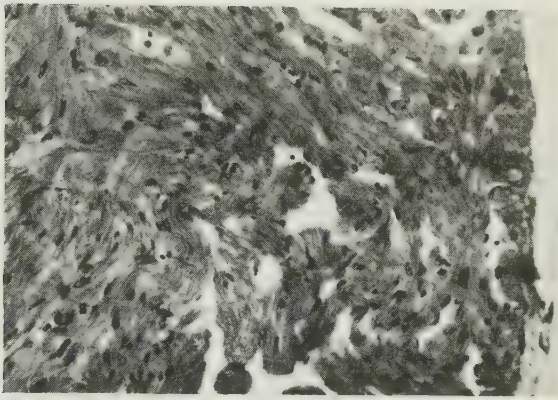


Abb. 29:
histologischer Schnitt
a) frisches Myocard



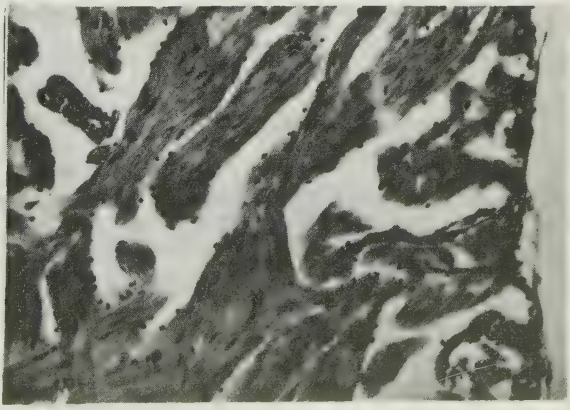
b) hypodynames Myocard

c) hypodynames Myocard
nach Phyllochinon-
Zugabe



d) frisches Myocard
Ausschnitt

e) hypodynames Myocard
Ausschnitt



f) hypodynames Myocard
nach Phyllochinon-
Zugabe
Ausschnitt

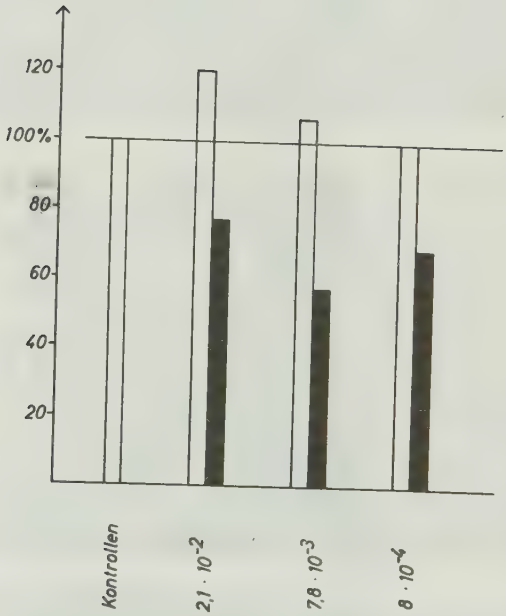


Abb. 30

Einfluß von Phyllochinon in verschiedenen Konzentrationen auf die Atmung frischer (weiße Säulen) und verarmter (schwarze Säulen) Herzhomogenate.

DISKUSSION

1. Die bisherigen Untersuchungen über enzymatische Cofaktoren der oxydativen Phosphorylierung wurden beinahe ausschließlich an den submikroskopischen Zellelementen durchgeführt. Man isolierte zu diesem Zweck die Mitochondrien oder ging so weit, diese mit chemischen oder physikalischen Mitteln zu zerlegen, um an ihnen die Einzelschritte der Reaktionsabläufe zu studieren. Es gehen fast alle bisherigen Kenntnisse von den biochemischen Eigenschaften des Mitochondriums aus derartigen Versuchen hervor.

Indessen setzt sich in jüngster Zeit mehr und mehr die Ansicht durch, daß der Zelle als funktionierendem Gesamtorganismus eine stärkere Beachtung geschenkt werden muß als bisher. Die Ergebnisse der submikroskopischen Zellmorphologie zeigten eindrucksvoll auch da noch offenbar hochdifferenzierte Strukturen, wo man früher nur ein Gemisch protoplasmatischer Kolloide vermutete. Es wird immer klarer, warum viele Stoffwechselleistungen der Zelle an eine solche intakte Struktur gebunden sind. Für die Untersuchungen der mitochondrialen Reaktionen sind jedenfalls die Grenzen der experimentellen Möglichkeiten mit desintegrierten Enzymsystemen bereits abzusehen, wie aus dem Folgenden deutlich wird.
In den letzten Jahren ist die große Bedeutung der Lipoide für den Aufbau der Mitochondrienwände und der Cristae mitochondriales bekanntgeworden. Präparationsmethoden, durch die Lipoide aus den Mitochondrien herausgelöst werden, sind geeignet, den Funktionszustand dieser Zellorganellen zu verändern (GREEN u. a.). Die Chinone scheinen in diesen Lipoidschichten verankert zu sein, so daß ihnen möglicherweise ebenfalls eine strukturbildende Funktion innerhalb der Mitochondrienmembranen zukommt. GREEN (33) sieht hierin den Grund dafür, daß Ubichinon in den Mitochondrien in sehr viel größeren Konzentrationen vorkommt als die übrigen Cofaktoren der oxydativen Phosphorylierung.

Es ist also sehr wahrscheinlich, daß eine künstliche Entfernung der Chinone zum Nachweis ihrer spezifischen Wirkung im Mitochondrium

zwangsläufig eine strukturelle Schädigung und damit nicht eindeutig zu interpretierende Versuchsergebnisse liefern muß.

In diesem Sinne sind sowohl die Ergebnisse Slaters (10) und Nasons (22, 23) zu bewerten, die Mitochondrien mit Isooktan extrahierten, wie auch der Versuch Nasons, durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen eine Inaktivierung des Tocopherols herbeizuführen. Ebenso fraglich müssen die Experimente Brodies u.a. (55) bleiben, die atmende Bakterien- und Pflanzenpräparate zur Phyllochinoninaktivierung einer ultravioletten Bestrahlung aussetzten. Die zuverlässigsten Ergebnisse scheint Martius (28, 29) mit seiner Methode der Vitamin K_1-Mangelernährung und darauffolgenden Isolierung und Untersuchung der Lebermitochondrien junger Hühner zu erhalten. Diese Methode führt jedoch im wesentlichen nur bei Vitamin K zum gewünschten Erfolg, während die übrigen Chinone so weitgehenden Speicherungsvorgängen im Organismus ausgesetzt sind, daß sie sich einer genauen Kontrolle entziehen.

Bezüglich des Stoffwechsels der energiereichen Phosphate verhält sich das Herz etwas anders als der normale Skelettmuskel. Kreatinphosphat hat offenbar für den Herzmuskel nicht ganz dieselbe Bedeutung wie für den Skelettmuskel. Während es nämlich in einem Gastroknemius bei Kontraktion ohne Sauerstoffzufuhr fast vollständig zerfällt, sinkt sein Spiegel im anoxybiotisch sich kontrahierenden Herzen nur um 20 - 30 %. Möglicherweise spielt für den Vorgang der Herzmuskelkontraktion das unmittelbar aus der Synthese bezogene ATP die größere Rolle. Das Froschherz scheint somit (s. oben) in mehrfacher Hinsicht besonders geeignet, um Vorgänge der oxydativen Phosphorylierung zu studieren.

Auffallend ist der relativ hohe ATP-Gehalt (80 - 90 %) im anoxybiotisch stillstehenden Herzen! Es muß angenommen werden, daß nicht sämtliches intrazellulär anzutreffende ATP für den Kontraktionsvorgang zur Verfügung steht, sondern in den verschiedenen submikroskopischen Zellräumen eventuell in gebundener Form vorliegt. Die von Dohrn demonstrierte Möglichkeit einer raschen positiv inotropen Stimulierung hypodynamer Herzen durch eine exogene Zufuhr von ATP zeigt, daß dieses Phänomen nicht durch Diffusionsschwierigkeiten hervorgerufen wird.

2. Zum Studium des Reaktionsmechanismus der oxydativen Phosphorylierung ist das hypodyname, überlebende Froschherz ein ausgezeichnetes biologisches Objekt. Abgeschnitten vom übrigen Organismus muß das Herz im Verlauf der Durchströmung zwangsläufig an Substraten und Cofaktoren des Stoffwechsels verarmen. Da die Schlagamplitude ermüdeter Herzen durch eine Zufuhr von Brennstoffen nur sehr unvollkommen wiederhergestellt wird, ist die Hypodynamie in hohem Maße Ausdruck einer solchen Cofermentverarmung. Beweise für diese Tatsache konnten durch die Steigerung von Schlagamplitude und Atmung hypodynamer Herzen nach Zufuhr von DPN und Cytochrom c erbracht werden. Die Bedeutung des Vitamins K in diesem Zusammenhang wurde ebenfalls durch die Wirkung dieses Vitamins auf die Schlagamplitude und die Atmung nachgewiesen. So erscheint also auch dieser Stoff oder sein wirksames Derivat im Herzstoffwechsel einem erheblichen Turnover und während der Durchströmung einem Abbau und Verlust unterworfen zu sein. Der eindeutige Nachweis einer aktivierenden Wirkung des Phyllochinons auf die ATP-Synthese gelang einmal durch den Nachweis eines erhöhten ATP-Spiegels hypodynamer Herzen nach Reaktivierung mit Vitamin K. Weiterhin konnte bei gleichzeitigem Anstieg der Kontraktionsleistung eine Abnahme des Sauerstoffverbrauchs festgestellt werden, die etwa 30 % betrug. Es kann daraus geschlossen werden, daß die Ermüdung eines Froschherzens mit dem Verlust eines Faktors einhergeht, der entweder aus dem Phyllochinon selbst besteht oder aus einer sehr nahe verwandten Substanz. Ausgehend von dem Martius'schen Schema der Atmungskette (Seite 17) würde ein Phyllochinonverlust den Ausfall der ersten Phosphorylierungsstufe, also eine partielle Entkopplung, zur Folge haben. Es liegt nun die Annahme nahe, daß die beobachtete Atmungsdepression hypodynamer Herzen nach Phyllochinonzugabe auf den Rückgang einer solchen bestehenden partiellen Entkopplung zurückzuführen ist - zumal damit eine Erhöhung der mechanischen Herzleistung verbunden ist. Obwohl weiterhin die Notwendigkeit einer genauen P/O-Quotient-Bestimmung hypodynamer und mit Phyllochinon reaktivierter Herzen besteht, um diese Vorstellung vollends zu sichern, glauben wir schon jetzt, die Befunde in diesem Sinne interpretieren zu dürfen.

Einer weiteren Überlegung bedarf der schnelle Eintritt der positiv inotropen Herzwirkung des Phyllochinons. Hierzu können vorerst nur Vermutungen geäußert werden. Martius nimmt an, daß die physiologisch wirksame Form der Reihe der K-Vitamine in dem von ihm gefundenen Derivat $K_{2(20)}$ zu suchen sei, da ein wesentlicher Teil der in seinen Versuchen eingesetzten Radioaktivität nach einigen Stunden auf diesen Stoff entfällt. In den vorliegenden Versuchen trat eine positiv inotrope Wirkung des Phyllochinons jedoch beinahe augenblicklich ein, woraus geschlossen werden darf, daß Phyllochinon wenigstens in einem gewissen Umfang selbst oder als sehr nahe verwandtes Derivat Eingang in den Stoffwechsel findet.

ZUSAMMENFASSUNG

Das überlebende, hypodyname Kaltblüterherz des Frosches ist ein geeignetes Testobjekt zur Untersuchung von Vorgängen der oxydativen Phosphorylierung. Es ist nicht nur an endogenen Substraten sondern auch an enzymatischen Cofaktoren verarmt und zwar so weitgehend, daß gezielte Substitutionsversuche durchgeführt werden können. Der besondere Vorteil, der sich hier bietet, ist die Koordinierung physiologischer und biochemischer Methoden mit der Möglichkeit der Gewinnung von Mitochondrien, die an Chinonen verarmt sind, aber trotzdem die intakte Funktionseinheit der phosphorylierenden Atmungskette enthalten. Durch die Koordinierung der Untersuchungen wird es möglich, das so schwierige Problem der Wirkungsspezifität von Chinonen bei der oxydativen Phosphorylierung anzugehen. Im Rahmen der bisherigen Untersuchungen konnten für Vitamin K eine diesbezügliche Spezifität nachgewiesen und damit die Vorstellungen in dieser Richtung erhärtet werden.

LITERATURVERZEICHNIS

(1) R. J. Olson, G. H. Dialameh u. R. Bentley,
Ciba Foundation symp. on quinones in electron transport,
Churchill, Ltd., London, S. 284, 1961

(2) O. Wiss, U. Gloor u. F. Weber,
ebenda S. 264

(3) H. Rudney u. T. Sugimura,
ebenda S. 211

(4) J. Boumann u. E. C. Slater,
Nature (London) 177, 1181 (1956)

(5) E. C. Slater, J. P. Colpa-Boonstra u. J. Links,
Ciba Foundation symp. on quinones in electron transport
Churchill, Ltd., London, S. 161, 1961

(6) B. Cowlishaw, E. Søndergaard, J. Prange u. H. Dam,
Biochim. Biophys. Acta 25, 644 (1957)

(7) J. Victor,
Amer. J. Physiol. 108, 229 (1934)

(8) O. B. Houchin u. H. A. Mattill,
J. Biol. Chem. 146, 301, 309, 313 (1942)

(9) C. Martius,
Proc. III, Internat. Congr. of Biochem. S. 1, Brüssel 1955

(10) E. C. Slater,
Proc. IV, Internat. Congr. of Biochem, Sympos. on Vitamin
Metab. S. 316, Wien 1958

(11) C. Martius u. E. Fürer,
Biochem. Z. 336, 474 (1963)

(12) R. A. Morton,
Nature (London) 182, 1764 (1958)

(13) R. A. Morton, U. Gloor, O. Wiss u. a.
Helv. Chim. Acta 41, 2343 (1958)

(14) R. L. Lester u. F. L. Crane,
J. Biol. Chem. 234, 2169 (1959)

(15) F. L. Crane,
Plant. Physiol. 34, 128 (1959)

(16) C. Martius,
Biochem. Z. 327, 407 (1956)

(17) C. Martius,
Dtsch. med. Wschr. 83, 1701 (1958)

(18) W. Stoffel u. C. Martius,
Biochem. Z. 333, 440 (1960)

(19) H.-G. Schiefer u. C. Martius,
Biochem. Z. 333, 454 (1960)

(20) C. Martius,
Ciba Foundation symp. on quinones in electron transport,
Churchill, Ltd., London, S. 312, 1961

(21) A. Nason u. J. R. Lehmann,
Federation Proc. 14, 259 (1955)
Science 122, 19 (1955)

(22) A. Nason u. J. R. Lehmann,
J. Biol. Chem. 222, 497 (1956)

(23) A. Nason, B. C. Averbach u. A. J. Terrell,
J. Biol. Chem. 222, 511 (1956)
Biochim. Biophys. Acta 19, 395 (1956)

(24) C. Martius u. D. Nitz-Litzow,
Biochim. Biophys. Acta 12, 134 (1953)

(25) Ch. L. Wadkins u. A. L. Lehninger,
J. Biol. Chem. 233, 1589 (1958)

(26) Ch. L. Wadkins u. A. L. Lehninger,
J. Biol. Chem. 234, 681 (1959)

(27) C. Martius,
Colloqu. Ges. Physiol. Chem., Mosbach/Baden S. 143 (1954)

(28) C. Martius u. D. Nitz-Litzow,
Biochim. Biophys. Acta 13, 152 (1954)

(29) C. Martius u. D. Nitz-Litzow,
Biochim. Biophys. Acta 13, 289 (1954)

(30) C. Martius u. R. Strufe,
Biochem. Z. 326, 24 (1954)

(31) C. Martius u. D. Nitz-Litzow,
Biochem. Z. 326, 26 (1954)

(32) D. E. Green,
Ciba Foundation symp. on quinones in electron transport,
Churchill, Ltd., London, S. 130, 1961

(33) D. E. Green,
Konfer. Ges. deutsch. Naturforscher u. Ärzte, Rottach-Egern
1962, Springer-Verlag, Berlin, S. 86, 1963

(34) C. Martius u. F. Märki,
Biochem. Z. 329, 450 (1957)

(35) Colpa-Boonstra, J. P. u. E. C. Slater,
Biochim. Biophys. Acta 23, 222 (1957)
Biochim. Biophys. Acta 27, 122 (1958)

(36) W. D. Wosilait u. A. Nason,
J. Biol. Chem. 206, 255 (1954)

(37) G. Scheibe u. H. Niemer,
Zschr. Biol. 107, 294 (1954)

(38) P. Dohrn,
Dissertation München 1959

(39) A. Wollenberger, O. Ristau u. G. Schoffa,
Pflügers Arch. 270, 399 (1960)

(40) A. E. Sobel, H. Yuska, J. Cohen
J. Biol. Chem. 118 , 443 (1937)

(41) Biochemica "Boehringer", ATP-Test, Art. TC-J 15979
Literatur siehe dort

(42) E. Meyer u. G. Seidel,
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 328, 262 (1962)

(43) K. Lohmann u. L. Jendrassik,
Biochem. Z. 303, 419 (1929)

(44) A. M. Alekseewa,
Biokhimiya (Moskau) 13, 516 (1948), 16, 97 (1951)

(45) E. Lundsgaard,
Biochem. Z. 217, 162 (1930)

(46) W. F. H. M. Mommaerts,
Amer. J. Physiol. 182, 585 (1955)

(47) A. Fleckenstein, J. Janke u. E. Gerlach,
Klin. Wschr. 37, 451 (1959)

(48) D. E. Green, D. E. Griffiths u. a.
Proc. V. Internat. Congr. Biochem., Moskau, 1961, S. 182, Band IV

(49) A. Versprille,
Pflügers Arch. 277, 684

(50) R. A. Morton,
Ciba Foundation symp. on quinones in electron transport,
Churchill, Ltd., London, S. 5, 1961

(51) Ziegler,
Internat. Union of Biochem., sympos. on biol. structure and function,
Stockholm 1960, Acad. Press New York S. 253, 1960

(52) Y. Hatefi u. a.
J. Biol. Chem. 237, 1676 (1962)

(53) P. D. Boyer u. a.
J. Biol. Chem. 237, 3306 (1962)

(54) F. Lynen u. R. Koenigsberger,
Liebigs Ann. Chem. 573, 60 (1951)

(55) A. F. Brodie u. J. Ballantine,
J. Biol. Chem. 235, 226 (1960), 235, 232 (1960).

L e b e n s l a u f

Am 1. Dezember 1937 wurde ich als Sohn des Arztes Dr. med. Claus Asbeck und seiner Ehefrau Almut, geb. Lampe, in Shanghai in China geboren. Nachdem ich die Kindheit und Vorschulzeit in der Lüneburger Heide verbracht hatte, besuchte ich den humanistischen Zweig des Gymnasiums für Jungen in Hamburg-Harburg, wo ich im Jahre 1957 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommer 1957 begann ich mit dem Medizinstudium an der Universität Freiburg/Br., wo ich im Sommer 1959 die medizinische Vorprüfung bestand. Im November 1959 wechselte ich die Universität, um mein Studium in München fortzusetzen und gleichzeitig von Januar 1960 bis April 1961 am Physiologisch-Chemischen Institut unter der Leitung von Prof. Dr. A. Butenandt und Priv. Doz. Dr. E. Meyer an der vorliegenden Dissertation zu arbeiten. Nach einer Fortsetzung des klinischen Studiums an der Universität Hamburg vom Sommer 1961 bis Sommer 1962 legte ich dort die medizinische Staatsprüfung im Dezember 1962 ab.

Als Pflichtassistent arbeitete ich in den Jahren 1963 bis 1965 an der Chirurgischen Klinik des städtischen Krankenhauses rechts der Isar in München, am Pathologischen Institut der Universität München, an der Medizinischen Universitätsklinik Hamburg-Harburg und an der Neurologischen Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf. Meine Approbation als Arzt erhielt ich am 31. 7. 1965.